Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Bohle)

Gehalt und Regulation von Fructosebisphosphatase im microdissezierten Rattennephron

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Michael Konrad Scholz

aus Düsseldorf

1979

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Bohle)

Gehalt und Regulation von Fructosebisphosphatase im microdissezierten Rattennephron

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Michael Konrad Scholz

aus Düsseldorf

1979

Dekan:	*Prof. Dr. med. H. Haselmann*
1. Berichterstatter:	*Prof. Dr. med. U. Schmidt* *(Prof. Dr. med. A. Bohle)*
2. Berichterstatter:	*Prof. Dr. rer. nat. D. Mecke*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Abbildungen und Tabellen	1
Abkürzungen	2
Einleitung	5
Kompartimentierung des renalen Kohlenhydratstoffwechsels	5
futile cycle - Modelle	9
Renaler FBPase/PFK-futile cycle	10
Renale Gluconeogenese	11
Nierenstoffwechsel bei Acidose	12
Material und Methoden	14
Material	14
Methoden	15
Rattenfütterung	15
Nierengewinnung und -aufarbeitung	16
Wässrige PAS-Färbung	18
SDH-Nachweis	18
Dissektion	19
FBPase in Einzelstrukturen des Rattennephrons	22
FBPase im Rattennierenhomogenat	27
Ergebnisse	28
FBPase im Homogenat	28
FBPase / Gewicht in Einzelstrukturen	29
Ausreißer	30
Normalverteilung (David-Test)	31
Varianzen (Bartlett-Test)	35
Mittelwerte (Varianzanalyse, Dunnett-Test, t-Test)	36
FBPase / Tubuluslänge	42

Seite

Diskussion der Methoden 44
Abhängigkeit von Versuchstag und Versuchstier 44
Spezifität der FBPase-Methode 46
Fehlerabschätzung 49
Längenmessung 50

Diskussion der Ergebnisse 52
FBPase im Homogenat der Normalratte 52
Gluconeogenese im Nierenhomogenat 53
FBPase im Nephron der Normalratte 55
FBPase im Nephron der Hungerratte 57
FBPase im Nephron der Acidoseratte 61
FBPase/PFK-futile cycle im Rattennephron 64
FBPase / Tubuluslänge 67
Zonierung des Kohlenhydratstoffwechsels 69

Zusammenfassung 71

Literaturverzeichnis 72

Nachwort 85

Lebenslauf 86

ABBILDUNGEN und TABELLEN

		Seite
Abb. 1	Architektur der Rattenniere	6
Abb. 2	Kohlenhydratstoffwechsel und Ammoniak-synthese der Rattenniere	8
Abb. 3	FBPase-Methode (Einzelstrukturen)	23
Abb. 4	FBPase im Rattennephron	41
Abb. 5	Gewebsabhängigkeit der FBPase-Aktivität	47
Abb. 6	Störung des FBPase-Tests durch gewebs-eigene Phosphogluconatdehydrogenase	48
Abb. 7	Markerenzyme der Gluconeogenese im Rattennephron	59
Abb. 8	Enzymaktivitäten des FBPase/PFK-futile cycles im Rattennephron	66
Tab. 1	Fütterungsexperiment nach Alleyne	15
Tab. 2	Lösungen zur FBPase-Methode (Einzelstrukturen)	25
Tab. 3	FBPase-Aktivität im homogenisierten Schnitt der Rattenniere	28
Tab. 4	FBPase-Gesamtaktivität / Trockengewicht	32
Tab. 5	FBPase-Restaktivität / Trockengewicht	33
Tab. 6	Spezifische FBPase-Aktivität / Trocken-gewicht	34
Tab. 7	FBPase-Aktivität / Tubuluslänge	43
Tab. 8	FBPase und PEPCK im Nephron der Normal-ratte	55
Tab. 9	G6Pase im Nephron von Mensch, Hund und Ratte	57
Tab.10	FBPase und PEPCK im Nephron der Hunger-ratte	58
Tab.11	FBPase und PEPCK im Nephron der Adicose-ratte	62
Tab.12	Enzymaktivitäten und Glucoseproduktions-raten / Längeneinheit	68

A B K Ü R Z U N G E N

Enzymnomenklatur: Empfohlener Name (Systematischer Name, EC) (nach 23 und 24)

A	48h-Acidoseratte
ADA	Adenosindesaminase (Adenosinaminohydrolase, EC 3.5.4.4)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ald	Fructosebisphosphataldolase (D-Fructose-1,6-bisphosphat-D-glycerinaldehyd-3-phosphatlyase, EC 4.1.2.13)
AMP	Adenosin-5'-monophosphat (als Index:) FBPase-Aktivität bei AMP-Hemmung
ASase	Adenylosuccinatlyase (Adenylosuccinat-AMP-lyase, EC 4.3.2.2)
Asp	Aspartat
ASS	Adenylosuccinatsynthetase (IMP:L-Aspartatligase (GDP bildend), EC 6.3.4.4)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Sammelrohr
Cys	Cystein
D	spezifische FBPase / Trockengewicht
DCT	Pars contorta des Mittelstücks
E	spezifische FBPase / Tubuluslänge
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
EtSH	Mercaptoäthanol
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
FBPase	Fructosebisphosphatase (D-Fructose-1,6-bisphosphat-1-phosphohydrolase, EC 3.1.3.11)
F6P	Fructose-6-phosphat
Fru	Fructose
G	Glomerulus
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (D-Glycerinaldehyd-3-phosphat:NAD^+oxidoreductase (phosphorylierend), EC 1.2.1.12)

GDP	Guanosin-5'-diphosphat
Glc	Glucose
GlDH	Glutamatdehydrogenase (L-Glutamat:NAD(P)$^+$oxidoreductase (desaminierend), EC 1.4.1.3)
Gln	Glutamin
Glnase	Glutaminase (L-Glutaminamidohydrolase, EC 3.5.1.2)
GlnT	Glutaminketosäureaminotransferase (L-Glutamin:2-Ketosäureaminotransferase, EC 2.6.1.15)
Glu	Glutamat
G1P	Glucose-1-phosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
G6Pase	Glucose-6-phosphatase(D-Glucose-6-phosphatphosphohydrolase, EC 3.1.3.9)
G6PDH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase (D-Glucose-6-phosphat:NADP$^+$-1-oxidoreductase, EC 1.1.1.49)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H	48h-Hungerratte
HK	Hexokinase (ATP:D-Hexose-6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1)
IMP	Inosin-5'-phosphat
JMN	Juxtamedulläres Nephron
K	48h-Acidosekontrollratte
αKetoGlu	α-Ketoglutarat
LDH	Lactatdehydrogenase (L-Lactat:NAD$^+$-oxidoreductase, EC 1.1.1.27)
m	Zahl der Bestimmungen zur FBPase / Tubuluslänge
n	Zahl der Bestimmungen zur FBPase / Trockengewicht
N	Normalratte
NAD$^+$/NADH	β-Nicotinamidadenindinucleotid oxidiert / reduziert
NADP$^+$/NADPH	β-Nicotinamidadenindinucleotidphosphat oxidiert / reduziert
n.s.	nicht signifikant
P_i	Phosphat, anorganisch
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reagens

PC	Pyruvatcarboxylase (Pyruvat:CO_2-ligase (ADP bildend), EC 6.4.1.1)
PCT	Pars contorta des Hauptstücks
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (GTP) (GTP: Oxalacetatcarboxylase (transphosphorylierend), EC 4.1.1.32)
PFK	6-Phosphofructokinase (ATP:D-Fructose-6-phosphat-1-phosphotransferase, EC 2.7.1.11)
PGI	Glucosephosphatisomerase (D-Glucose-6-phosphatketolisomerase, EC 5.3.1.9)
6PGluconat	6-Phosphogluconat
6PGDH	Phosphogluconatdehydrogenase (6-Phospho-D-gluconat:$NADP^+$2-oxidoreductase (decarboxylierend), EC 1.1.1.44)
PK	Pyruvatkinase (ATP:Pyruvat-2-O-phosphotransferase, EC 2.7.1.40)
PST	Pars recta des Hauptstücks
R	Spannweite der FBPase / Trockengewicht
Rib5P	Ribulose-5-phosphat
s	Standardabweichung der FBPase / Trockengewicht
S	Spannweite der FBPase / Tubuluslänge
SCN	Subcapsuläres Nephron
SDH	Succinatdehydrogenase (Succinat:(Akzeptor) oxidoreductase, EC 1.3.99.1)
$s_{\bar{x}}$	Standardabweichung des Mittelwertes
t	Standardabweichung der FBPase / Tubuluslänge
TAL	Dicker aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife
TIM	Triosephosphatisomerase (D-Glycerinaldehyd-3-phosphatketolisomerase, EC 5.3.1.1)
tot	(Index:) FBPase-Gesamtaktivität
TPH	dünner ab- und aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife
Triose-P	Triosephosphate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridin-5'-diphosphat
$\bar{x}$	Mittelwert FBPase / Trockengewicht
$\bar{y}$	Mittelwert FBPase / Tubuluslänge

E I N L E I T U N G

Kompartimentierung des renalen Kohlenhydratstoffwechsels

Die hohe morphologische Differenzierung des Nierenparenchyms ist Ausdruck der physiologischen und metabolischen Spezialisierung der Zelltypen im Verlauf des Nephrons. Der Histologe unterteilt die Niere im wesentlichen nach zwei Prinzipien. Er definiert Nierenschichten (z.B. Cortex und Medulla) und Nephronsegmente (z.B. pars contorta des Hauptstücks und Sammelrohr). Folgende schematische Darstellung (Abb. 1) rekapituliert die Nierenhistologie.

Dieser bekannten morphologischen Strukturierung wird in jüngster Zeit der Begriff der metabolischen Kompartimentierung der Niere gegenübergestellt. Gemeint ist damit eine funktionelle Inhomogenität der Zellpopulationen des Gesamtorgans in Bezug auf enzymatische Ausstattung und hormonelle Regulation. Während experimentelle Befunde eine enge Korrelation der metabolischen Kompartimente mit den histologisch definierten Nephronsegmenten nahelegen, sind die Beziehungen zu den Nierenschichten eher indirekter Art.
Weil funktionell und metabolisch homogene Zellpopulationen in der Niere nur auf mikroskopisch kleinem Raum definiert werden können, müssen hohe Anforderungen an das physiologische und biochemische Experimentieren auf der Ebene von Nephronsegmenten gestellt werden. Das führte zur Entwicklung der Methoden der modernen Perfusionstechniken einerseits und der quantitativen Histochemie andererseits.

Es hat sich als nützlich erwiesen, die Potenz eines metabolischen Kompartiments in Bezug auf einen bestimmten Stoffwechselweg durch die Aktivität der jeweils geschwindigkeitsbegrenzenden und einer Regulation unterworfenen Enzyme abzuschätzen. So wird in dieser Arbeit versucht,

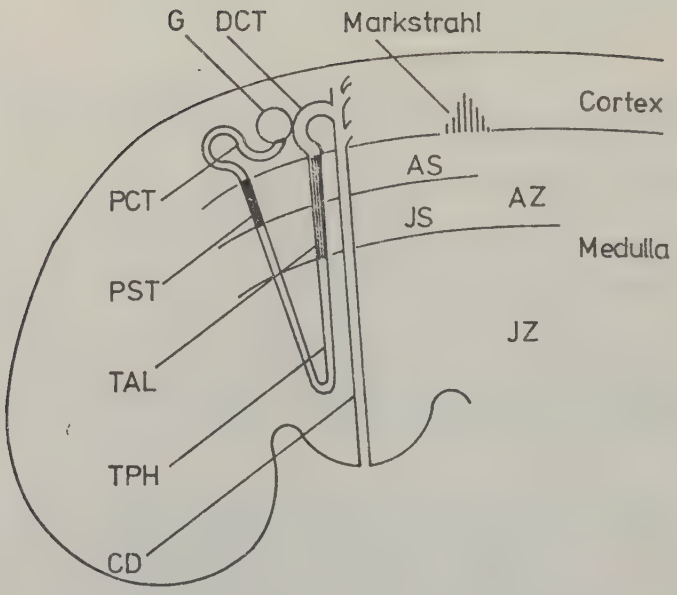


Abb. 1: Architektur der Rattenniere
(Nomenklatur nach Kriz, 52)

Schichten:

Cortex	Nierenrinde	
Medulla	Nierenmark (= AZ + IZ)	
AZ	Außenzone (= AS + IS)	
IZ	Innenzone	
AS, IS	Außenstreifen, Innenstreifen	

Strukturen:

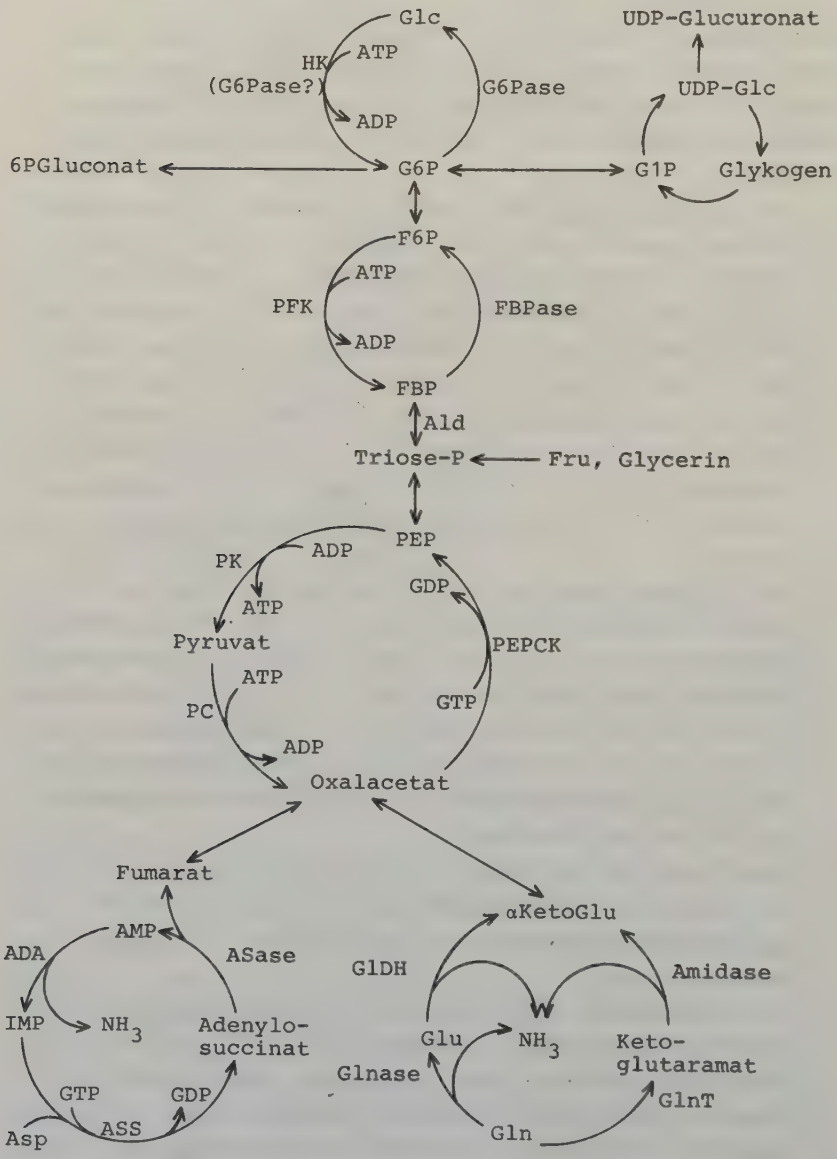
G	Glomerulus	
PCT	Pars contorta des Hauptstücks	
PST	Pars recta des Hauptstücks	Henle'sche Schleife
TPH	Dünner ab- und aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife	
TAL	Dicker aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife	
DCT	Pars contorta des Mittelstücks	
CD	Sammelrohr	

durch die Bestimmung der Fructosebisphosphatase (FBPase, EC 3.1.3.11) in microdissezierten Rattennierenstrukturen einen Beitrag zum Verständnis des renalen Kohlenhydratstoffwechsels zu leisten.

Eine Zusammenfassung unserer Kenntnisse auf diesem Gebiet gibt folgendes Modell, das aus den bekannten quantitativ histochemischen Experimenten zur Glycolyse und Gluconeogenese von Schmidt und Guder (85) entwickelt wurde (siehe Abb. 2):

1. Die glykolytische Aktivität liegt maximal in den distalen Nephronstrukturen (TAL, DCT und CD) vor. In den proximalen Strukturen (PCT und PST) ist diese Energiequelle unter normalen Bedingungen nicht ausreichend zur Aufrechterhaltung der aktiven Transportprozesse, wird aber in der oligurischen Phase des Akuten Nierenversagens 5- bis 8-fach gesteigert (84). Die Schlüsselenzyme der Glykolyse Hexokinase (EC 2.7.1.1) (87) und Pyruvatkinase (EC 2.7.1.40) (32) bilden in allen Strukturen ein einheitliches Enzymmuster mit konstanten Proportionen.
2. Die Gluconeogenese ist mit fallender Aktivität auf PCT und PST begrenzt. Die Validität der gemessenen geringen Aktivitäten im TAL ist fraglich. Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (GTP) (PEPCK, EC 4.1.1.32) (31) gilt als Schlüsselenzym aufgrund einer guten Korrelation der Aktivität mit Glucoseproduktionsraten auch in verschiedenen Stimulationszuständen, wie z.B. metabolische Acidose, Fasten und Diabetes.
3. Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (EC 1.2.1.12) (88) und Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27) (82) sind als bidirektionale Enzyme nicht repräsentativ für einen Stoffwechselweg.
4. In dieses Modell können die vorliegenden Messungen zur Glucose-6-phosphatase (G6Pase, EC 3.1.3.9) noch nicht eingeordnet werden. Trotz methodisch verschiedener Ansätze bei Mensch (7), Hund (60) und Ratte (88) ist eine spezifische Messung des Enzyms in allen Einzelstruktu-

Abb. 2: Kohlenhydratstoffwechsel und Ammoniaksynthese der Rattenniere



ren noch nicht erzielt worden. Die meisten Autoren ordnen die Glucose-6-phosphatase der Gluconeogenese zu. In Übereinstimmung mit dieser Funktion zeigt sie auch ein der PEPCK vergleichbares Stimulationsverhalten beim Fasten (85).

futile cycle - Modelle

In diesem Modell der morphologischen Trennung von Glykolyse und Gluconeogenese wird eine möglicherweise nierenspezifische Antwort auf das Problem der futile cycles gegeben (44,62). Weil sowohl die Enzyme der Glykolyse als auch die der Gluconeogenese im Cytosol des Nierenhomogenats gefunden werden - das heißt im selben intrazellulären Kompartiment - lassen sich aus den Enzymen, die nicht beiden Stoffwechselwegen gemeinsam sind, 3 futile cycles zwischen folgenden Verbindungen konstruieren (siehe Abb. 2):

1. Glucose / Glucose-6-phosphat
2. Fructose-6-phosphat / Fructose-1,6-bisphosphat
3. Pyruvat / Oxalacetat / Phosphoenolpyruvat

Gemäß der Definition des futile cycles wird jeweils zur Bildung der phosphorylierten Verbindung Energie in Form von ATP oder GTP verbraucht, ohne bei der Dephosphorylierung in Form einer energiereichen Verbindung wiedergewonnen zu werden. Wie groß sind die Umsetzraten und der Energieverlust durch diese futile cycles in der Rattenniere? Die Lösungsansätze für dieses Problem sind bislang indirekter Art, weil nur für die Leber in Experimenten mit doppelt markierten Substraten Durchsatzraten (41) und der Energieverlust durch substrate cycling (12) bestimmt wurden, die sich nicht auf die Niere übertragen lassen. Für das Ganztier (Kaninchen) bestimmten Dunn et al. (20) ein futile cycling von jeweils etwa 10 % auf der Ebene von Glucose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat.

Drei Modelle für die simultane Katalyse antagonistischer Prozesse sind von N. Katz und Jungermann (45) am Beispiel der Leber formuliert worden:

1. Es besteht nur ein Zelltyp und ein gemeinsamer Pool aller Metaboliten des Intermediärstoffwechsels. Die Stoffwechselwege werden aufgrund hormoneller Beeinflussung und autoregulatorischer Effektorenkonzentrationen bevorzugt in eine Richtung katalysiert, wobei aber die futile cycles ablaufen.
2. Es besteht ebenfalls nur ein Zelltyp; die Stoffwechselwege sind aber durch Enzymassoziationen und Multienzymkomplexe getrennt, sodaß keine futile cycles ablaufen.
3. Es bestehen mehrere Zelltypen mit getrennter Enzymausstattung.

Renaler FBPase/PFK-futile cycle

Es gibt experimentelle Anhalte dafür, daß im Kohlenhydratstoffwechsel der Niere möglicherweise alle drei beschriebenen Mechanismen zur Minimierung des Fructosebisphosphatase/6-Phosphofructokinase-(FBPase/PFK)-Cyclus in Anwendung kommen:

1. gegensätzliche Beeinflussung der Stoffwechselwege durch
   a. Hormone:Glucocorticoide, Parathormon und Noradrenalin (30) und
   b. Metaboliten: Citrat, Acetyl-CoA, Purinnucleotide (AMP, ATP) und Zuckerphosphate (F6P und FBP unter Berücksichtigung von Konstitution und Konfiguration) (62, 63, 50) sowie
   c. Protein-Protein-Wechselwirkungen: FBPase-PFK (69, 96)
2. Multienzymkomplexe im Sinne des für Rattenmuskulatur beschriebenen "glycolytic complex" (14; noch nicht für die Niere bestätigt)
3. metabolische Zelldifferenzierung (85).

In einigen Fällen hat sich der futile cycle Fructose-6-phosphat/Fructose-1,6-bisphosphat als sehr nützlich erwiesen, z.B. zur Wärmeproduktion im Flugmuskel von bestimmten Insektenarten (64) und zur Verstärkung der allosterischen Kontrolle über Glykolyse und Gluconeogenese in der Muskulatur mariner Säuger (38). Solange es noch an Experimenten mit der Niere mangelt, soll mit folgendem Modell nach Befunden an Rattenhepatocyten eine hypothetische Funktion des renalen Fructose-6-phosphat/Fructose-1,6-bisphosphat-Cyclus aufgezeigt werden: Da keine Regulation auf der Ebene der Phosphorylierung von Fructose, Glycerin, Dihydroxiaceton und Glycerinaldehyd nachweisbar ist, kommt dem Fructose-6-phosphat/Fructose-1,6-bisphosphat-Cyclus nach Clark (13) für die in die Gluconeogenese jenseits der PEPCK eingeschleusten Substrate die regulatorische Rolle der Verteilung auf Glycolyse und Gluconeogenese zu. In der hepatischen Gluconeogeneseregulation scheint dieser Cyclus einen Angriffspunkt für den Mediator cAMP darzustellen (49).

Nachdem die Microdissektionsexperimente zur PEPCK in der Niere eine Beschränkung der gluconeogenetischen Aktivität dieser initialen Stufe auf die proximalen Strukturen ergaben, ohne eine klare Aussage über die Aktivität im TAL zuzulassen, und zur Glucose-6-phosphatase widersprüchliche Ergebnisse publiziert wurden, erscheinen Experimente zur Fructosebisphosphatase sinnvoll, weil sie

1. das dritte Schlüsselenzym der Gluconeogenese ist und
2. im futile cycle Fructose-6-phosphat / Fructose-1,6-bisphosphat katalysiert.

Renale Gluconeogenese

Die Übertragung der an der Leber gewonnenen Befunde zur Gluconeogenese auf die Niere ist nicht statthaft, weil sich die Gluconeogenese beider Organe in Funktion und Regulation unterscheidet. Einen physiologisch relevanten

Beitrag zur Konstanthaltung des Blutglucosespiegels liefert die renale Gluconeogenese nur beim hepatectomierten Tier (75) und (nach Befund am Menschen) beim prolongierten Fasten (66). Obwohl die renale arteriovenöse Differenz der Glucosekonzentration dem Blutglucosespiegel grob proportional ist (22), unterliegt die Glucoseproduktion der Niere (nach Befunden am Hund) vorrangig einer Stimulation durch ihre Substrate (18). Hierbei bedeutet die Synthese von Glucose als neutralem und "energiereichem" Molekül (mit der sich fakultativ anschließenden Glykogenese) aus den dem Blut nach Rückresorption aus dem Primärharn nicht wieder zugeführten kurzkettigen schwachen Säuren erstens eine Konstanthaltung des Blut-pH, zweitens eine Energieeinsparung, indem oxidierbare Substrate nicht mit dem Harn verlorengehen. Mit diesem Modell wird eine Gluconeogenesestimulation bei Fasten, körperlicher Arbeit und den Diabetes mellitus diskutiert.

Nierenstoffwechsel bei Acidose

Im Zustand der Acidose verläuft im allgemeinen der vermehrten Ammonium-Exkretion parallel eine Stimulation der renalen Gluconeogenese, welche die bei der doppelten Desaminierung von Glutamin gebildete schwache Säure α-Ketoglutarat in Glucose umsetzt (29). Den fundamentalen Unterschied zwischen hepatischer und renaler Gluconeogenese beleuchten Experimente, die zeigen, daß bei Acidose die Glucoseproduktion der Leber nicht gesteigert ist (93). Auch in der Niere ist der Zusammenhang nicht zwingend, d.h. Ammoniaksynthese und Gluconeogenese unterliegen einer getrennten Regulation.
Bei jedem der beiden Desaminierungsschritte auf dem Weg der Bildung von α-Ketoglutarat aus Glutamin wird ein Proton freigesetzt, das in den folgenden Stoffwechsel des α-Ketoglutarat wieder miteingehen muß, um den Nettogewinn an Bikarbonat, der durch die Ammoniaksekretion erreicht wird,

nicht wieder zunichte zu machen. Möglich ist erstens eine Oxydation des α-Ketoglutarat zu CO_2 und H_2O und zweitens eine Gluconeogenese ausgehend vom α-Ketoglutarat.
Die aufgeführten Untersuchungen gelten ausnahmslos nur für die chronische Acidose. Wenige Stunden nach einer einmaligen Ammoniumchloridgabe sind sowohl Ammoniumproduktion als auch Gluconeogenese gehemmt (72).

Weil neben der Lokalisation der Gluconeogenese im Nephron auch die Lokalisation und das Ausmaß ihrer Stimulation interessieren, werden beide hypothetischen Funktionen der renalen Gluconeogenese in je einem exemplarischen Versuch überprüft:

1. Ist die FBPase durch zweitägiges Fasten (vermittelt durch saure Intermediate) stimuliert?
2. Ändert eine zweitägige NH_4Cl-Acidosefütterung die FBPase-Aktivität? Denn schließlich ist die FBPase ein Enzym der Gluconeogenese, welche vom Produkt der Desaminierung bei Ammoniumexkretion durchlaufen wird.

Die Experimente zur Stimulation der Gluconeogenese überprüfen die auf Befunde zur renalen PEPCK gegründete Hypothese, daß die gluconeogenetische Zonierung der Niere eine statische ist, festgelegt durch die Morphologie des Nephrons, im Gegensatz zur dynamischen, hepatischen Gluconeogenesezonierung (47).

M A T E R I A L und M E T H O D E N

MATERIAL

Microtom:	R. Jung, Heidelberg
Kryostat:	W. Dittes, Heidelberg
Operationsmikroskope für	
- Dissektion:	Wild, Heerbrugg, Schweiz
- Wägung und Pipettierung:	Leitz, Wetzlar
Lichtmikroskope:	Zeiss, Unterkochen
Injektionsnadeln zur Dissektion:	Kratz, Dreieich/Frankfurt
Kaltlicht:	Schott, Mainz
Minipotter:	Braun, Melsungen
Spectrofluorometer:	Farrand Optical Co, New York, USA
Elektrowaage:	Cahn Ventron Instruments Co, Paramount, California, USA
Konstriktionspipetten:	Holte, Dänemark und Pedersen, Dänemark
Marburg-Pipetten als Teil des benutzten Eppendorf-Mikrolitersystems	Hamburg

Reagenzien:

Tetranitrotetrazolium-chlorid-blau:	EGA-Chemie, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und Na-Succinat:	Serva, Heidelberg
BSA (Cohn Fraktion V):	Sigma, St. Louis, USA
alle anderen Salze, Säuren, Laugen, Lösungsmittel und Farbstoffe:	Merck, Darmstadt
alle anderen Substrate, sowie alle Enzyme:	Boehringer, Mannheim
Ratten:	Stamm Wistar, Zucht S. Ivanovas, Kisslegg
Futter:	Altromin

METHODEN

Rattenfütterung

Die Messungen dieser Arbeit wurden an 15 männlichen Wistar-Ratten, Zucht Ivanovas, vorgenommen. Das Fütterungsexperiment begann nach zweitägiger Gewöhnung der Tiere an ihr Trinkwasser und das Halten in Einzelkäfigen jeweils morgens um 8 Uhr: Alle Tiere hatten freien Zugang zu ihrem Trinkwasser (siehe Tab. 1). Die Normalratte erhielt Altromin-Standarddiät ad libitum. Die Acidose- und Acidosekontrollratte wurde allein durch die Glucose der Sondenfütterung ernährt. Zur Nivellierung des Blutglucosespiegels wurde dem Trinkwasser der sondenernährten Tiere Glucose in geringer Konzentration zugesetzt. Die Ratten erhielten die Lösungen (modifiziert nach Alleyne & Scullard, 1) jeweils um 8 und 20 Uhr in leichter Äthernarkose über eine Schlundsonde. Bei der Hungerratte wurde dafür Sorge getragen, daß sich zu Beginn ihrer Fastenperiode keine Futterreste mehr im Käfig befanden.

Tab. 1: Fütterungsexperiment modifiziert nach Alleyne (1), alle Lösungen in Leitungswasser

Fütterungszustand	Nahrung	Trinkwasser (ad libitum)
Normalratte	Altromin	0,18 % NaCl
Hungerratte	Ø	0,18 % NaCl
Acidoseratte	2 x täglich 10 ml	20 mM NH_4Cl
	0,15 M NH_4Cl	2 % Glucose
	20 % Glucose	0,18 % NaCl
Acidosekontrollratte	2 x täglich 10 ml	2 % Glucose
	20 % Glucose	0,18 % NaCl

Die Ratten befanden sich in einem Nacht-Tag-Rhythmus mit Nahrungsaufnahme nachts und Gewichtsverlust tagsüber. Wäh-

rend des zweitägigen Fütterungsexperiments hat das Körpergewicht der Normalratten um 5 g zugenommen, das aller anderen Tiere abgenommen und zwar bei der Hungerratte um 30 g, der Acidoseratte um 35 g und der Acidosekontrollratte um 25 g. Bei Versuchsende boten die Ratten folgende mittleren Körpergewichts: Normalratten 269 g, Hungerratten 208 g, Acidoseratten 214 g und Acidosekontrollratten 214 g. Verlauf der Körpergewichts im Experiment und Absolutgewicht vor der Dekapitierung sind Mittelwerte der Daten aller untersuchten Tiere: 5 Normal-, 4 Hunger-, 3 Acidose- und 3 Acidosekontrollratten. Außer den drei Vierergruppen wurden also drei einzeln behandelte Ratten in die Gesamtauswertung mit aufgenommen, weil sich ihre FBPase-Aktivitäten trotz ihres zum Teil abweichenden Körpergewichts nicht signifikant von den in den Vierergruppen gemessenen Werten unterscheiden (siehe Diskussion).
Der Erfolg der Fütterung zeigte sich im Urin-pH: Acidoseratte 4,5; Hungerratte 5,5; Normal- und Kontrollratte 6,0-8,0.
Zur Zeit des maximalen Fütterungseffekts, zwei Stunden nach der letzten Fütterung, wurden die Tiere dekapitiert. Die in der Literatur gebräuchlichen Namen "48-h-Acidose" und "48-h-Fasten" werden trotz der um zwei Stunden längeren Versuchsdauer auch in dieser Arbeit benutzt.

Nierengewinnung und -aufarbeitung

Nach Dekapitierung wurde das Abdomen mit einem Längs- und Querschnitt eröffnet, beide Nieren entnommen und dekapsuliert und mit einem Rasiermesser 3 mm dicke Scheiben aus der Niere und aus diesen Scheiben dreieckige Gewebskeile mit der Spitze an der Papille und der Dreiecksbasis am Cortex herausgeschnitten. Diese Segmente wurden mit Traganth an Kryostatblöcke geklebt und innerhalb einer Minute nach Dekapitierung des Tieres in flüssige Luft getaucht. (Methode nach Schmidt & Dubach, 83). Anästhetika wurden we-

gen ihrer eventuellen metabolischen Aktivität nicht benutzt.

Gemäß den Methoden der Quantitativen Histochemie wurde folgendes Prinzip angewandt, um aus Gewebsschnitten wohldefinierte Strukturen zu gewinnen: Von zwei angrenzenden Schnitten wird der eine nativ lyophilisiert. Der andere wird zur Identifizierung der Strukturen des lyophilisierten Schnitts histochemisch gefärbt. Weil im Nierengewebe zur Unterscheidung der untersuchten Nephronsegmente eine Färbung nicht ausreicht, wurde die Methode modifiziert: Von je 3 Schnitten wurde der mittlere lyophilisiert und die beiden angrenzenden gefärbt, der eine mit einer PAS-Färbung, der andere mit einer SDH-Färbung.

Nach dem Gefrierstop wurde das Gewebe innerhalb von 2 Stunden in einer luftdicht verschlossenen feuchten Kammer im Kryostat zum Temperaturausgleich auf -20°C gebracht. Am Microtom wurden native Seriengefrierschnitte von 16 µm Dicke hergestellt und abwechselnd

1. auf einen abgeflammten Glycin-Albumin-Objektträger zur PAS-Färbung aufgetaut
2. in Schnittkammern (57) gelegt
3. auf Glycin-Albumin-Objektträger zum Nachweis der Succinatdehydrogenase (SDH, EC 1.3.99.1) aufgetaut.

Die belegten Glycin-Albumin-Objektträger wurden in einer feuchten Kammer außerhalb des Kryostaten vor Austrocknung geschützt. Die gefüllten Schnittkammern wurden verschlossen und in vorgekühlte Lyophilisierröhren (57) eingebracht. Die Färbung bzw. Lyophilisierung schließt sich unmittelbar als nächster Arbeitsgang an.
Die Lyophilisierung wurde bei -40°C und 6,7 Nm^{-2} mit 2 Aceton-Trockeneis-Kühlfallen zwischen Pumpe und Gewebe über 12 Stunden durchgeführt. Das lyophilisierte Gewebe kann in der evakuierten Röhre bei -40°C unbegrenzt gelagert werden.

Die Lösungen und Arbeitsgänge der beiden Färbungen sind in den folgenden Schemata zusammengefaßt:

Wässrige PAS-Färbung (modifiziert nach McManus, 61)

- 5 min in frisch angesetzte Perjodsäure
- 3 x wässern mit aqua dest.
- 20 min oder länger bis Schnitte satt rosa gut abgedeckt in Schiffsches Reagens
- 10 min fließendes Wasser von 38°C
- 1 min Kernfärbung mit gefiltertem Hämalaun
- 15 min fließendes Wasser von 38°C
- 2 min kaltes Wasser
- je 5 min in der aufsteigenden Alkoholreihe: 20 %, 40 %, 70 %, 96 %, frischer absoluter Alkohol
- 5 min Xylol, dann nicht eintrocknen lassen, sondern mit Eukitt und Deckglas abdecken und über Nacht trocknen lassen.

SDH-Nachweis (modifiziert nach Lojda et al., 54)

Salzlösung:

0,25 %	$CaCl_2$	3 ml
0,6 M	$NaHCO_3$	20 ml
0,05 M	$MgCl_2$	2 ml
0,01 M	$AlCl_3$	8 ml
0,02 M	KCN	20 ml

auf pH 7,5 einstellen, auf 100 ml mit aqua dest. auffüllen und filtrieren.

SDH-Reagens:

40 ml	Tetranitrotetrazoliumchlorid-blau 1 mg/ml gelöst in 2 ml N,N-Dimethylformamid
40 ml	Salzlösung
40 ml	Natrium-Succinat 0,2 M
40 ml	Phosphatpuffer 0,2 M pH 7,6

Färbegang:

- 20 min bei 37°C mit SDH-Reagens inkubieren
- in NaCl-Lösung 0,9 % spülen
- 10 min in Formalin 10 % fixieren
- je 5 min in der aufsteigenden Alkoholreihe: 20 %, 40 %, 70 %, 96 %, frischer absoluter Alkohol
- 5 min Xylol, dann mit Eukitt und Deckglas abdecken.

Bei Anwendung dieser beiden Färbemethoden gelingt die Identifizierung aller gesuchten Strukturen am lyophilisierten Schnitt.
Vor der Dissektion wird die Lyophilisierröhre unter Vakuum auf Zimmertemperatur gebracht. Sie wird nur in der Klimakammer bei einer konstanten Temperatur von 18°C und einer Luftfeuchtigkeit von 40 % zur Entnahme eines oder mehrerer Schnitte kurzfristig geöffnet. Das nicht benötigte Gewebe kann dann evakuiert bei -40°C ohne signifikanten Aktivitätsverlust weiter gelagert werden.

Dissektion

Die Dissektion erfolgte unter einem Operationsmikroskop im Durchlicht mit 50 - 100facher Vergrößerung. Parallel wurden die beiden Färbungen bei gleicher Vergrößerungsstufe (125fach) in Lichtmikroskopen betrachtet, sodaß die 6 untersuchten Strukturen wie folgt identifiziert werden konnten (vgl. Abb. 1):
Glomeruli unterscheiden sich durch die kreisförmige Struktur ihres Kapillarknäuls und ihren weit über einem Tubulusquerschnitt liegenden Durchmesser (100 µm) schon im lyophilisierten Schnitt vom angrenzenden Gewebe. In der PAS-Färbung werden sie blaß violett, in der SDH-Färbung werden sie nicht getönt. Die Dissektion erfolgte aus dem ganzen Cortex, weil auch für die Tubulusstrukturen eine Differenzierung in juxtamedulläres und subcapsuläres Nephron nicht vorgenommen wurde.
Proximale Convolute sind im lyophilisierten Schnitt strukturdichter und homogener als Glomeruli. Sie zeigen nur selten ein Lumen. Es wurden nur an Glomeruli angrenzende PCTs im Cortex disseziert, die sich typischerweise als wurstförmige Strukturen mit 70 µm Längs- und 40 µm Querdurchmesser darstellen. Sie sind von einem lockeren Bindegewebssaum umgeben. Ihr Cytoplasma ist im PAS-Schnitt violett, die einreihig basalständigen Kerne sind graublau ge-

färbt. Der SDH-Nachweis setzt bei der einzelnen Zelle einen basalen dunkelbraunen Streifen von halber Zellhöhe gegen einen hell granulierten apikalen Teil ab, der im Zellverband des PCTs gegenüber dem Ring aus angefärbten basalen Mitochondriensäumen aller Zellen ein Lumen vortäuscht.
Proximale partes rectae strukturieren durch ihre Bündelung in den Markstrahlen und ihr Überwiegen im Außenstreifen, der den Cortex vom Innenstreifen des Marks abteilt, den lyophilisierten Schnitt. Sie sind im Längsschnitt über Strecken bis zur Breite des Außenstreifens (650 µm) parallel getroffen bei einem Durchmesser von 45 µm, zeigen ein wabiges Lumen und sind im Cytoplasma nicht ganz so dicht wie die parallel liegenden TALs. Der PAS-Schnitt zeigt ihr Cytoplasma intensiv violett, den Bürstensaum zinnoberrot und die einreihig mittelständigen Kerne graublau. Die SDH-Färbung charakterisiert sie durch einen braunen basalen und einen hell granulierten apikalen Streifen, der sich oft schwer gegen ein Lumen abgrenzen läßt. Wie bei allen anderen Strukturen wurden die proximalen partes rectae ohne Berücksichtigung ihrer Zugehörigkeit zum superfiziellen oder juxtamedullären Nephron disseziert.
Die dicken aufsteigenden Teile der Henle'schen Schleife stellen sich im lyophilisierten Schnitt als schmale (25 µm), dichtere Strukturen zwischen den PSTs des Außenstreifens dar mit Auszipflungen in Spalten zwischen je zwei aufeinanderstehenden PST-Enden. Im PAS-Schnitt zeigt ihr Cytoplasma dunkelviolette, ihre Zellkerne zeigen eine graublaue Färbung. Im SDH-Schnitt bilden sie zwei dunkelbraune Cytoplasmastreifen, getrennt durch ein schmales Lumen, was sie vom Sammelrohr unterscheidet, das bei PAS-Färbung nicht vom TAL differenziert werden kann.
Distale Convolute sind in Nachbarschaft zum Glomerulus - nur hier wurden sie disseziert - als Konglomerate aus 2 bis 5 Querschnitten mit oft weit offenem Lumen und strukturdichtem Cytoplasmasaum getroffen (Durchmesser 30-40 µm, das sind nur 2/3 des PCT-Durchmessers). In der PAS-Färbung stellt sich ihr Cytoplasma dunkler violett als die angren-

zenden PCTs, ihr mittelständiger Zellkern graublau dar. Im SDH-Schnitt zeigt ein hellbraunes Cytoplasma nicht die für PCTs typische Differenzierung in einen basalen und apikalen Zellpol.
Sammelrohre erkennt man im lyophilisierten Schnitt am lokker strukturierten Cytoplasma und wabigen Lumen bei einem Durchmesser von 30 µm. Die PAS-Färbung fällt für sie und TALs identisch aus. Im SDH-Schnitt erfolgt keine Anfärbung. Sie wurden im Außenstreifen disseziert.

Der dünne ab- und aufsteigende Schenkel der Henle'schen Schleife ist der in dieser Arbeit benutzten Lowry-Technik (57) nicht zugänglich, wohl aber der Burg-Technik (9), für die allerdings die Rattenniere ungeeignetes Untersuchungsmaterial liefert.

Zur Dissektion der einzelnen Nephronsegmente aus dem lyophilisierten Schnitt dienten auf Tuberkulinspritzen aufgesteckte Injektionsnadeln (19). Die Längsachse der präparierten Stücke wurde unter dem Operationsmikroskop mit einem Okularmaßstab vermessen. Dann wurden die Tubuli mit einem in einen zugespitzten Glasstab eingeklebten Augenbrauenhaar auf einen Gewebehalter (19) transportiert und aufgereiht. Dabei wurde unter einer α-Strahlenquelle gearbeitet, um die durch die Manipulationen des Arbeitsgangs bedingte elektrostatische Aufladung des Gewebes auf das für das Haften der Tubuli am Transporthaar notwendige Mindestmaß zu beschränken. Der Gewebehalter wurde in einer Petrischale zur Waage transportiert und in einen Mikromanipulator eingesetzt (19). Zur Wägung an einer Quarzfadenwaage (83) wurde der Gewebehalter mit dem Mikromanipulator in den Wägeraum eingefahren und der jeweilige Tubulus unter stereomikroskopischer Sicht mit einem Transporthaar auf die Quarzfadenspitze aufgeladen. Nach Ausfahren des Gewebehalters wurde der Wägeraum verschlossen und die Deflexion des Fadens am geeichten Okularmaßstab abgelesen.

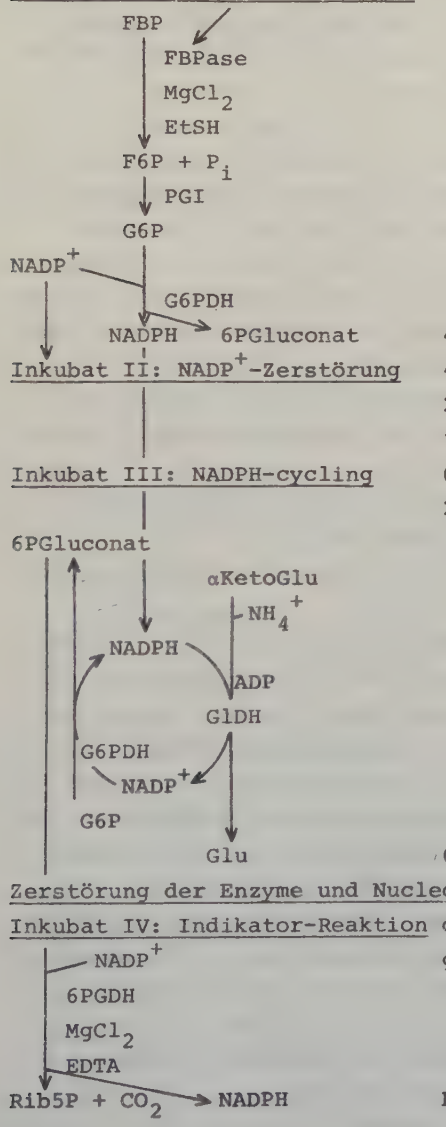
Zur Eichung wird die Deflexion des Quarzfadens bei Beladung mit geeigneten Chininhydrobromidkristallen im Okular abgelesen. Jeder Kristall wird in je 1 ml 0,1 N H_2SO_4 gelöst. Aus der Fluorescenz der Lösung errechnet sich das für die Eichgerade der Quarzfadenwaage benötigte Gewicht des Kristalls (83).

FBPase in Einzelstrukturen des Rattennephrons

Die angewandte Methode zur Bestimmung der FBPase-Aktivität (89) ist die Kombination eines photometrischen Enzymtests zur FBPase (53 , modifiziert für Messungen an Leber- und Nierengewebe), der wegen der Kleinheit der eingesetzten Gewebsproben in der oil-well-technique (57) ausgeführt wird, mit dem cyclisierenden Verstärkersystem des NADPH-cycling (modifiziert nach Lowry et al., 58). Die Öltröpfchentechnik reduziert das Volumen des Ansatzes durch Benutzung von Kapillarpipetten im nl-Bereich und von Bohrungen in Teflonplatten als Reaktionsgefäße, die zum Schutz gegen Verdunstung mit Öltropfen verschlossen werden. Im NADPH-cycling (siehe Abb. 3) wird durch die beiden Enzyme des Cycling-Reagens Glutamatdehydrogenase (GlDH) und Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PDH) unter den gewählten Bedingungen jedes Mol NADPH etwa 8000 mal in der Stunde in $NADP^+$ und wieder zurück verwandelt, wobei bei jedem Cyclus je ein Mol Glucose-6-phosphat (G6P) und α-Ketoglutarat in Glutamat (Glu) und 6-Phosphogluconat (6PGluconat) mit umgesetzt werden. Das Produkt 6-Phosphogluconat wird so in der anschließenden Indikatorreaktion meßbar, während das ursprüngliche NADPH noch unter der Nachweisgrenze lag.

Arbeitsgang der FBPase-Bestimmung in microdissezierten Strukturen der Rattenniere:
Mit Hilfe stereoskopischer Betrachtung durch ein Operationsmikroskop (26fach) werden unter Kaltlichtbeleuchtung folgende Lösungen mit Mikropipetten in die Bohrungen ei-

Abb. 3: FBPase - Methode (Einzelstrukturen)



	400 nl TrisHCl; 0,05 % BSA
	4 - 70 ng; Eiskühlung
	400 nl FBPase-Reagens (pH 8):
	1,2 mM
	10 mM
	48 mM
	14 U/ml (25°C)
	1 mM
	2,8 U/ml (25°C)
	40 min bei 37°C; Eiskühlung
	400 nl vom Inkubat I zu
	200 µl 0,05 M Cys/0,04 N NaOH
	10min bei 60°C; Eiskühlung
	6 µl vom Inkubat II zu
	25 µl Cycling-Reagens:
	5 mM
	25 mM
	0,3 mM
	18 U/ml (25°C)
	4,9 U/ml (25°C)
	1 mM
	60 min bei 37°C
	Kochstop; Eiskühlung
	dazu 200 µl Indikator-Rea-
	gens: 0,1 mM
	0,3 U/ml (25°C)
	3,3 mM
	0,1 mM
	Fluorometer 340/360 nm

ner schwarzen Teflonplatte eingebracht:

1. für die Gewebsproben: je 400 nl Tris-Puffer (1.) - auf diesen Tropfen wird sofort das Gewebe mit einem Transporthaar gelegt -
2. für den Leerwert: 2 mal je 400 nl Tris-Puffer (1.)
3. für die Eichkurve: je 2 mal 400 nl der Verdünnungsreihe der NADPH-Standard-Stammlösung (2.)
   Standard A/B/C mit 0,244/0,122/0,061 mMol NADPH/l
   (Konzentration etwa 0,1/0,05/0,025 nMol)

Jeder Tropfen wird sofort mit 2 Tropfen Paraffinöl abgedeckt, um das Verdunsten der Lösung zu verhindern. Nach 10 min Abkühlung der Teflonplatte im Eisbad werden unter Beibehaltung der Eiskühlung zu jedem Tropfen durch die Ölabdeckung 400 nl FBPase-Reagens (3.) zupipettiert, zur Messung der FBPase-Gesamtaktivität Lösung 3a., zur Messung der nicht-AMP-hemmbaren FBPase-Restaktivität Lösung 3b. Beide Lösungen geben aufgrund der geringen Fluorescenz des 1 mM AMP identische Leerwerte.

Die Teflonplatte wird nach 2 min Temperaturausgleich 40 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die ablaufenden Reaktionen (Formulierung in Abb. 3) werden durch Eiskühlung (10 min) gestoppt.

Zur Zerstörung des nicht umgesetzten $NADP^+$ werden von der eisgekühlten Teflonplatte aus jedem Inkubattropfen 400 nl in vorgelegte 200 µl der Natronlauge (4.) in Polyäthylenreaktionsgefäße (Volumen 1,5 ml) überpipettiert. Dieses Inkubat II wird 10 min bei 60°C im Wasserbad erhitzt. Es folgt Eiskühlung (10 min) und Sammeln des Kondensats am Boden des Gefäßes durch Zentrifugation. Je 6 µl vom Inkubat II werden mit einer Konstriktionspipette in vorgelegte 25 µl Cyclingreagens (5.) pipettiert. Zum NADPH-cycling wird das Inkubat III für 60 min in ein Wasserbad von 37°C gebracht. (Die Reaktionen des Verstärkersystems sind in Abb. 3 formuliert.)

Es schließt sich zur Zerstörung der Enzyme und Nucleotide im Inkubat III ein Kochstop von 90-120 sec an, dann Eiskühlung und Zentrifugation des Kondensats.

Tab. 2: Lösungen zur FBPase-Methode (Einzelstrukturen)

1. Tris - Puffer

0,1	M	Tris·HCl pH 8,0
0,05	%	Rinderserumalbumin (= BSA)

2. NADPH - Standard-Stammlösung

0,1	M	Tris·HCl pH 8,0
0,05	%	BSA
0,244	mM	NADPH
2,44	mM	Natriumbicarbonatpuffer pH 10,6

3. FBPase-Reagens 3a. FBPase-Gesamtaktivität

0,1	M	Tris·HCL pH 8,0
0,05	%	BSA
1,2	mM	Fructose-1,6-bisphosphat (= FBP)
10	mM	$MgCl_2$
48	mM	Mercaptoäthanol (= EtSH)
14	U/ml	Phosphoglucoisomerase (= PGI)
1	mM	$NADP^+$
2,8	U/ml	Glucose-6-phosphatdehydrogenase (= G6PDH)

3b. FBPase-Restaktivität: wie 3a., zusätzlich:

1	mM	5'-Adenosinmonophosphat (= AMP)

4. Natronlauge 0,05 M L-Cystein; 0,04 N NaOH

5. Cyclingreagens

0,1	M	Tris·HCl pH 8,0
0,02	%	BSA
5	mM	α-Ketoglutarsäure (= αKetoGlu)
25	mM	Ammoniumacetat
0,3	mM	5'-Adenosindiphosphat (= ADP)
18	U/ml	Glutamatdehydrogenase (= GlDH)
4,8	U/ml	Glucose-6-phosphatdehydrogenase (= G6PDH)
1	mM	Glucose-6-phosphat (= G6P)

6. Indikatorreagens

0,02	M	Tris·HCl pH 8,0
0,05	%	BSA
0,093	mM	NADP
0,3	U/ml	6-Phosphogluconatdehydrogenase (= 6PGDH)
3,3	mM	$MgCl_2$
0,1	mM	EDTA

Je 200 µl Indikatorreagens (6.) werden ins Inkubat III pipettiert. Nach 10 min Inkubation der Indikatorreaktion (siehe Abb. 3) bei 37°C erfolgt die fluorimetrische Messung des gebildeten NADPH mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm bei 460 nm.
Für jede Standardkonzentration errechnet sich ein Faktor nach der Formel:

$$f = Vol \times St \times t^{-1} \times Fl^{-1}$$

f = Faktor (U)
Vol = Pipettenvolumen des zugegebenen Standards (l)
St = NADPH-Konzentration des Standards (µM)
t = Inkubationszeit mit FBPase-Reagens (min)
Fl = Fluorimeterskalenteile (Standard - Leerwert)

Für Standard und Leerwert gilt jeweils der Mittelwert. Die Differenz aus den Fluorimeterskalenteilen einer Gewebsprobe und des Leerwertes wird durch Multiplikation mit dem mittleren Faktor des jeweiligen Versuchstags geeicht. Die Aktivität einer Probe ergibt sich durch Bezug auf ihr Trockengewicht:

$$Akt = (P - Lw) \times f \times Gew^{-1}$$

Akt = Aktivität der Probe (U/g Trockengewicht)
P = Fluorimeterskalenteile der Probe
Lw = Fluorimeterskalenteile des Leerwerts
Gew = Gewicht der Probe (g)

Weil eine Hemmung aller unspezifischen im Zellaufschluß mitgemessenen FBPase-Aktivitäten nicht möglich ist, wohl aber eine Hemmung der spezifischen FBPase, wird die spezifische FBPase-Aktivität definiert als die Differenz aus der gemessenen FBPase-Gesamtaktivität und der bei Hemmung der spezifischen FBPase mit AMP verbleibenden unspezifischen FBPase-Restaktivität (95).

FBPase im Rattennierenhomogenat

Die Endkonzentrationen der Lösungen entsprechen weitgehend den oben für die FBPase-Bestimmung im microdissezierten Nephron angegebenen. Weil das FBPase-Reagens bei der Homogenatsmethode nicht zu gleichen Teilen mit Tris-Puffer (1.) verdünnt wird, werden abweichend von den oben angegebenen Vorschriften folgende Konzentrationen eingesetzt:

3. FBPase - Reagens für Homogenatsversuche

3c. FBPase-Gesamtaktivität

0,1	M	Tris·HCl pH 8,0
0,05	%	BSA
0,62	mM	Fructose-1,6-bisphosphat
5	mM	$MgCl_2$
24	mM	Mercaptoäthanol
3,5	U/ml	Phosphoglucoisomerase
0,5	mM	$NADP^+$
0,7	U/ml	Glucose-6-phosphatdehydrogenase

3d. FBPase-Restaktivität wie 3c., zusätzlich:

1	mM	5'-Adenosinmonophosphat

Ein bis zwei lyophilisierte Schnitte werden auf einer Elektrowaage abgewogen (zusammen 150-250 µg Trockengewicht) und 1 : 1 (Gewicht : Volumen) in Tris-Puffer (1.) 6 mal 5 sec im Eisbad mit dem Minipotter homogenisiert. Mit dieser Homogenatsstammlösung (10 µg Trockengewicht/10 µl) wird auf 3 Verdünnungsstufen gearbeitet, indem im Eisbad mit FBPase-Reagens (3.) eine Verdünnungsreihe: 476; 238 und 119 ng/10 µl hergestellt wird. Entsprechend wird die NADPH-Standard-Stammlösung mit FBPase-Reagens auf $6,2 \times 10^{-5}$; $3,1 \times 10^{-5}$; $1,55 \times 10^{-5}$ mol NADPH/l verdünnt. Nach 30 min Inkubation im Wasserbad bei 37°C wird die Reaktion im Eisbad gestoppt, zentrifugiert und 150 µl 0,1 N NaOH zu jeweils 50 µl Inkubat bzw. Standard bzw. FBPase-Reagens-Leerwert pipettiert. Es folgt die Messung am Fluorimeter bei 340/460 nm (Blende jeweils 10).
Ein NADPH-cycling k a n n angeschlossen werden.

E R G E B N I S S E

FBPase im Homogenat

Die Bestimmung der FBPase-Aktivität in homogenisierten, lyophilisierten Schnitten der Rattenniere mit nicht identischer Cortex/Medulla-Relation liefert Richtwerte zur Größenordnung der in den Einzelstrukturen zu erwartenden Aktivität und zum prozentualen Anteil der unspezifischen nicht AMP-hemmbaren FBPase-Restaktivität an der FBPase-Gesamtaktivität (etwa 13 % im Homogenat bei allen Fütterungszuständen). In der folgenden Tabelle sind Bestimmungen mit und ohne NADPH-cycling zum Mittelwert zusammengefaßt (Zahl der Bestimmungen in Klammern). Ein statistischer Vergleich der Fütterungszustände wurde wegen mangelnder Einheitlichkeit der Gewinnung des Materials (Cortex/Medulla-Relation) nicht angestellt. Die spezifische FBPase-Aktivität wurde als Differenz der beiden Mittelwerte für FBPase-Gesamt- und FBPase-Restaktivität des jeweiligen Fütterungszustandes abgeschätzt.
Weitere Angaben über die Validität des Tests sind dem Abschnitt "Diskussion der Methoden" zu entnehmen.

Tab. 3: FBPase-Aktivität in U/g Trockengewicht im homogenisierten Schnitt der Rattenniere

Fütterungszustand	FBPase-Gesamtaktiv. U/g	FBPase-Restaktiv. U/g	% der Gesamtaktiv.	spez. FBPase-aktivität U/g
Normalratte	34,7 (9)	3,7 (2)	11	31,0
Hungerratte	30,1 (3)	3,8 (1)	13	26,3
Acidoserat.	46,8 (2)	5,8 (1)	12	41,0
Kontrollrat.	33,5 (3)	5,0 (1)	15	28,5

(Zahl der Bestimmungen in Klammern)

FBPase / Gewicht in Einzelstrukturen

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Messungen zur FBPase-Aktivität in 6 Strukturen des Rattennephrons in Abhängigkeit vom Fütterungszustand der Ratte geben die Tabellen 4 und 5.
Im folgenden werden die histologisch definierten Segmente im Verlauf des Nephrons in ihrer deutschen und angelsächsischen Nomenklatur und den in dieser Arbeit benutzten Abkürzungen gegenübergestellt (52):

G Glomerulus (glomerulus)
PCT Pars contorta des Hauptstücks (proximal tubule convoluted portion)
PST Pars recta des Hauptstücks (proximal tubule straight portion)
TPH Dünner ab- und aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife (loop of Henle, descending and ascending thin limb)
TAL Dicker aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife (loop of Henle, ascending thick limb)
DCT Pars contorta des Mittelstücks (distal tubule)
CD Sammelrohr (collecting tubule)

(Der Begriff der Henle'schen Schleife umfaßt die Strukturen vom PST bis zum TAL.)
Die für die Fütterungszustände benutzten Abkürzungen lauten:

N = Normalratte Futter ad libitum
H = Hungerratte 48h Fasten
A = Acdioseratte 48h Acidosefütterung
K = Kontrollratte 48h Acidosekontrollfütterung

Die FBPase-Gesamtaktivität (x_{tot}, Tab. 4) setzt sich zusammen aus der unspezifischen nicht AMP-hemmbaren FBPase-Aktivität (Restaktivität, x_{AMP}, Tab. 5) und der spezifischen AMP-hemmbaren FBPase-Aktivität (D, Tab. 6). Die spezifische FBPase-Aktivität errechnet sich nicht als Mittelwert von Differenzen je zwei gemessener, gepaarter Werte zur

FBPase-Gesamt- und -Restaktivität, weil die Werte aus methodischen Gründen nicht an derselben Probe und aus Gründen der Versuchsplanung nicht alle an derselben Ratte und am selben Versuchstag gewonnen wurden. Die errechnete Differenz ist mit folgenden Streuungen behaftet:

1. dem physiologischen Aktivitätsgradienten entlang der Struktur,
2. den interindividuellen Schwankungen in der Basisaktivität und im Ansprechen auf die Fütterung und
3. den Schwankungen in der Konstanthaltung der experimentellen Bedingungen und Eichungen von Tag zu Tag.

Ausreißer

Von 269 Meßergebnissen zur FBPase-Gesamtaktivität wurden 25 als Leerwerte und Ausreißer im oberen Extrembereich nicht gewertet.
Gewebsmengen unter der FBPase-Nachweisgrenze wurden eingesetzt

1. vor Ermittlung der minimalen Gewebsmenge (Faustregel für FBPase-Gesamtaktivität Minimum: G 25 ng; PCT 4 ng; PST, TAL und DCT 5 ng; CD 6 ng) und
2. bei Verlust von Gewebe während des Transports ins Inkubat speziell bei gepoolten Proben.

Ursachen für Ausreißer im oberen Extrembereich sind

1. unsaubere Dissektion (DCT und G grenzen unmittelbar ans PCT mit 10facher Aktivität),
2. fluorescierende Verunreinigung.

Von 143 Werten zur FBPase-Restaktivität mußten ebenfalls 12 Messungen als Extremwerte gestrichen werden.
Die genannten methodischen Schwierigkeiten machen die Überprüfung des Zahlenmaterials und das Streichen der Ausreißer notwendig.

Die Meßwerte sind nach den Parametern FBPase-Gesamt- (x_{tot}), FBPase-Restaktivität (x_{AMP}), Fütterungszustand (N, H, A

und K) und Struktur (G, PCT, PST, TAL, DCT und CD) zu Gruppen zusammengefaßt. Tab. 4 und 5 zeigen das arithmetische Mittel ($\bar{x}$), Stichprobenumfang (n), Standardabweichung (s) und Spannweite (R).

Normalverteilung

Die für die folgenden Vergleiche benutzten statistischen Tests setzen Normalverteilung der Stichproben voraus. Darum wurden die Stichproben einzeln anhand des Quotienten R/s auf Normalverteilung geprüft (David et al. (17); Tabellen bei Pearson et al. (67)): Das Vorliegen einer Normalverteilung muß mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2,5 % nur abgelehnt werden für die FBPase-Restaktivität im PCT bei Acidose. Hier zeigen die Meßwerte eine zu geringe Wahrscheinlichkeitsdichte im unteren Grenzbereich.
Eine weitere Überprüfung der Homogenität der Stichproben stellen ihre Verteilungskurven dar, die für alle Strukturen, mit Ausnahme der Glomeruli, Gaußsche Glockenkurven bilden.

Im Glomerulus zeigen die Meßwerte zweigipflige Verteilungskurven, ohne daß aufgrund des David'schen Prüfquotienten die Normalverteilung der Werte zu verwerfen ist. Hypothesen zu diesem von den anderen Strukturen abweichenden Verteilungsmuster der Glomeruli sind:

1. Der Leerwert stellt eine enge Begrenzung des Bereichs der gewerteten Bestimmungen vom Mittelwert in Richtung auf kleinere Werte hin dar. Das läßt eine linksgipflige Verteilung erwarten.
2. Glomeruli besitzen die geringsten gemessenen Aktivitäten. In der Ablesung am Fluorimeter ist der Leerwert doppelt so groß wie der mittlere Meßwert für Glomeruli (nach Subtraktion des Leerwertes), wobei die Doppelbestimmungen zur Ermittlung des Leerwerts um durchschnittlich 10 % des Absolutbetrags differieren.
3. Die unmittelbar an Glomeruli angrenzenden PCTs besitzen

Tab. 4: FBPase-Gesamtaktivität / Trockengewicht
Zusammenfassung und Prüfung der Stichproben auf gleiche Varianzen und gleiche Mittelwerte

Struk	Füt	$\bar{x}_{tot}$	n_{tot}	s_{tot}	R_{tot}	Var_{tot}	P_{tot}
G	N	4,5	19	3,2	13,3	> 0,50	> 0,50
	H	5,4	9	3,3	8,4		
	A	5,8	10	3,8	12,2		
	K	5,7	6	5,2	13,3		
PCT	N	90,0	24	34,5	134,0	> 0,10	< 0,001
	H	123,6	14	31,5	100,3		
	A	147,8	13	41,8	154,4		
	K	87,9	13	20,6	73,2		
PST	N	61,4	19	20,8	66,7	> 0,10	> 0,10
	H	68,1	11	24,1	78,9		
	A	71,2	10	18,3	55,2		
	K	50,8	13	12,0	41,8		
TAL	N	19,4	11	10,3	34,0	> 0,60	> 0,50
	H	19,0	7	10,8	30,4		
	A	24,8	10	14,6	51,6		
	K	17,6	6	9,0	27,5		
DCT	N	12,6	9	6,1	18,8	> 0,80	> 0,20
	H	20,8	7	8,3	23,2		
	A	13,0	8	7,8	21,6		
	K	14,3	6	8,4	19,9		
CD	N	9,6	4	1,8	3,8	< 0,005	> 0,50
	H	9,9	4	3,8	8,5		
	A	6,6	5	2,5	5,9		
	K	9,4	6	13,6	35,8		

Struk Struktur Füt Fütterungszustand

$\bar{x}_{tot}$ FBPase-Gesamtaktivität Mittelwert U/g Trockengewicht

Var_{tot} Sicherheit der Homogenität der Varianzen aller 4 Fütterungszustände im Bartlett-Test (3)

P_{tot} Wahrscheinlichkeit der Identität der Mittelwerte der FBPase-Gesamtaktivität in allen 4 Fütterungszuständen in der einfachen Varianzanalyse (99)

n_{tot}, s_{tot}, R_{tot} siehe Tab. 5; N,H,A,K siehe Tab. 7

Tab. 5: FBPase - Restaktivität / Trockengewicht
Zusammenfassung und Prüfung der Stichproben auf gleiche Varianzen und gleiche Mittelwerte

Struk	Füt	$\bar{x}_{AMP}$	n_{AMP}	s_{AMP}	R_{AMP}	Var_{AMP}	p_{AMP}
G	N	4,4	10	2,2	6,4	<0,005	>0,05
	H	3,7	8	1,1	2,7		
	A	2,7	10	0,4	1,2		
PCT	N	16,0	10	4,3	13,7	>0,10	>0,20
	H	19,5	8	5,0	15,7		
	A	21,1	8	8,2	19,9		
PST	N	10,6	8	2,0	6,1	>0,025	>0,01
	H	9,3	7	2,6	8,2		
	A	15,4	8	5,3	13,4		
TAL	N	5,3	9	3,1	8,8	>0,10	>0,50
	H	4,6	9	1,6	4,5		
	A	4,0	7	2,4	6,7		
DCT	N	8,2	5	2,7	7,2	>0,70	>0,50
	H	8,5	5	2,1	5,0		
	A	7,6	6	3,0	8,0		
CD	N	7,0	6	3,3	9,2	>0,50	>0,50
	H	8,3	2	4,0	5,7		
	A	6,1	5	2,1	4,9		

Struk Struktur Füt Fütterungszustand

$\bar{x}_{AMP}$ FBPase-Restaktivität - nicht AMP-hemmbare FBPase-Aktivität, Mittelwert U/g Trockengewicht

n_{AMP} Zahl der Bestimmungen

s_{AMP} Standardabweichung U/g Trockengewicht

R_{AMP} Spannweite U/g Trockengewicht

Var_{AMP} Sicherheit der Homogenität der Varianzen der FBPase-Restaktivität in allen drei Fütterungszuständen im Bartlett-Test (3)

p_{AMP} Wahrscheinlichkeit der Identität der Mittelwerte der FBPase-Restaktivität in allen drei Fütterungszuständen in der einfachen Varianzanalyse (99)

N,H,A Normalratte, Hungerratte, Acidoseratte

Tab. 6: Spezifische FBPase-Aktivität / Trockengewicht
Vergleich der Fütterungszustände

Struk	Füt	D	Var_{tA}	P_{tA}	$p_D^{N/i}$	$s_{\bar{x}tot}$	$s_{\bar{x}AMP}$	$s_{\bar{D}}$
G	N	0,1	<0,005	>0,20		0,7	0,7	1,0
	H	1,7	(ohne AMP-A:			1,1	0,4	1,2
	A	3,1	>0,01)			1,2	0,1	1,2
PCT	N	74,0	<0,005			7,0	1,4	7,2
	H	104,1			<0,02	8,4	1,8	8,6
	A	126,7			<0,001	11,6	2,9	12,0
PST	N	50,8	<0,005			4,8	0,7	4,8
	H	58,8			>0,30	7,3	1,0	7,3
	A	55,8			>0,50	5,8	1,9	6,1
TAL	N	14,1	<0,005			3,1	1,0	3,3
	H	14,4			>0,95	4,1	0,5	4,1
	A	20,8			>0,20	4,6	0,9	4,7
DCT	N	4,4	>0,025	>0,01		2,0	1,2	2,4
	H	12,3				3,1	0,9	3,3
	A	5,4				2,8	1,2	3,0
CD	N	2,6	<0,005	>0,50		0,9	1,3	1,6
	H	1,6	(ohne tot-K:			1,9	2,8	3,4
	A	0,5	>0,70)			1,1	0,9	1,5

Struk Struktur Füt Fütterungszustand
D spezifische FBPase-Aktivität U/g Trockengewicht
Var_{tA} Sicherheit der Homogenität der Varianzen von FBPase-Gesamt- und -Restaktivität in allen Fütterungszuständen im Bartlett-Test (3)
P_{tA} Wahrscheinlichkeit der Identität der Mittelwerte der FBPase-Gesamt- und -Restaktivität in allen Fütterungszuständen in der einfachen Varianzanalyse (99)
$p_D^{N/i}$ Wahrscheinlichkeit der Identität der Aktivitäten der spezifischen FBPase im Fütterungszustand N und i (H,A) in gleicher Struktur geprüft im zweiseitigen t-Test
$s_{\bar{x}tot}$ Standardabw. des Mittelw. $FBPase_{tot}$ U/g Trockengew.
$s_{\bar{x}AMP}$ " " $FBPase_{AMP}$ U/g "
$s_{\bar{D}}$ " " spez.FBPase U/g "
N,H,A Normalratte, Hungerratte, Acidoseratte

eine zwanzigfache Aktivität. Bleiben bei einer unsauberen Dissektion 5 Gewichtsprozente PCT am Glomerulus, so verdoppelt dies die Aktivität der Probe:

50 ng G mit 4,5 U/g ≙ $2{,}25 \cdot 10^{-7}$ U

2,5 ng PCT mit 90 U/g ≙ $2{,}25 \cdot 10^{-7}$ U zusammen:

4,5 U in einer Probe von 52,5 ng ≙ 8,6 U/g.

4. Vergleichbare Bilder in allen Fütterungszuständen legen die Möglichkeit der Dissektion aus zwei Glomeruluspopulationen mit unterschiedlicher Enzymausstattung nahe. Eine Auftrennung in subcapsuläres und juxtamedulläres Nephron wurde tatsächlich nicht vorgenommen. Schmidt & Dubach (82) konnten für 3 von 7 untersuchten Enzymen im Glomerulus signifikante Unterschiede zwischen beiden Nephrontypen der Ratte sichern. Wie unten gezeigt wird, handelt es sich bei der FBPase-Gesamtaktivität im Glomerulus mit großer Wahrscheinlichkeit um unspezifische Enzyme mit FBPase-Aktivität. In anderen Strukturen mit überwiegend unspezifischer FBPase liefert das Verteilungsmuster der Ergebnisse keine Hinweise auf eine differente Ausstattung der Nephrontypen mit unspezifischer FBPase.

Varianzen

Aufgrund der mit ausreichender Wahrscheinlichkeit in allen Stichproben vorliegenden Normalverteilung darf die Homogenität der Varianzen der Messungen zur FBPase-Gesamtaktivität (Var_{tot}, Tab. 4) und FBPase-Restaktivität (Var_{AMP}, Tab. 5) für jede Struktur mit dem Bartlett-Test geprüft werden (3). Homoskedastizität ist Voraussetzung für die im Vergleich der Mittelwerte angewandte Varianzanalyse.
Auf dem 1 %-Signifikanzniveau ergibt sich Heteroskedastizität für 2 von 12 Gruppen: $FBPase_{AMP}$ im G und $FBPase_{tot}$ im CD. Die Ursache liegt in beiden Fällen in einer erheblichen, experimentell bedingten Abweichung der Spannweite der Meßergebnisse in jeweils einem Fütterungszustand von den Ver-

hältnissen in allen anderen Zuständen.
Anwendung des Bartlett-Tests auf alle 7 Varianzen der Stichproben zur FBPase-Gesamt- und -Restaktivität des DCT sowie auf 6 Varianzen des G (bei Ausklammern der $FBPase_{AMP}$ bei Acidose) und des CD (bei Ausklammern der $FBPase_{tot}$ bei Acidose-Kontrolle) zeigt Homoskedastizität auf dem 1 %-Niveau (Var_{tA}, Tab. 6), sodaß für diese 3 Strukturen auf Identität ihrer Mittelwerte in FBPase-Gesamt- und -Restaktivität getestet werden kann.

Mittelwerte

Varianzanalyse
Für jede Struktur können nun getrennt die Mittelwerte der FBPase-Gesamtaktivitäten und FBPase-Restaktivitäten in den verschiedenen Fütterungszuständen miteinander verglichen werden. Identität bedeutet: in dieser Struktur ist weder im Hunger noch bei Acidose die entsprechende FBPase-Aktivität (Gesamt- oder Restaktivität) stimuliert oder gehemmt. Muß die Identität verworfen werden, so wird ein Dunnett-Test angeschlossen, der prüft, in welchem Fütterungszustand ein signifikanter Einfluß auf die entsprechende FBPase-Aktivität wirksam wird. Wie die Tabellen 4 und 5 zeigen, ergibt der Vergleich der Mittelwerte zur FBPase-Gesamtaktivität (p_{tot}, Tab. 4) und FBPase-Restaktivität (p_{AMP}, Tab. 5) für jede Struktur anhand der einfachen Varianzanalyse (99) Identität der Mittelwerte auf dem 5 %-Signifikanzniveau für alle Strukturen außer PCT der $FBPase_{tot}$ und PST der $FBPase_{AMP}$.

Aufgrund der Homoskedastizität im Bartlett-Test kann für 3 Strukturen - G, DCT und CD - eine Trennung in FBPase-Gesamtaktivität und FBPase-Restaktivität aufgehoben werden und mit einer Varianzanalyse auf die Identität der Mittelwerte von FBPase-Gesamt- und -Restaktivität geprüft werden. Identität bedeutet: In dieser Struktur liegt keine signifikante spezifische FBPase-Aktivität vor. Denn dann unter-

scheiden sich d i e beiden Aktivitäten nicht signifikant voneinander, aus deren Differenz sich die spezifische FBPase-Aktivität errechnet. Muß aufgrund der Varianzanalyse die Identität verworfen werden, schließt sich ein Dunnett-Test an. Der aufgrund der Homoskedastizität der Stichproben für G, DCT und CD mögliche Vergleich der Mittelwerte zur FBPase-Gesamt- und -Restaktivität (p_{tA}, Tab. 6) zeigt Identität der Mittelwerte auf dem 5 %-Niveau nur für G und CD.

Dunnett-Test

Für die 3 Gruppen, in welchen die Identität der Mittelwerte aller Stichproben auf dem 5 %-Niveau abgelehnt wird, prüft der Dunnett-Test die Mittelwerte von Hunger-, Acidose- und Kontrollratte einzeln gegen den der Normalratte (21):

1. Die FBPase-Gesamtaktivität zeigt im PCT Identität der Mittelwerte von Normal- und Kontrollratte auf dem 5 %-Niveau. Hunger- und Acidoseratte unterscheiden sich signifikant ($\alpha < 0{,}01$) von der Normalratte.
2. Die FBPase-Restaktivität im PST ist identisch für Normal- und Hungerratte auf dem 5 %-Niveau, für Normal- und Acidoseratte auf dem 1 %-Niveau.
3. Der Vergleich der FBPase-Gesamt- und -Restaktivität aller Fütterungszustände im DCT gegen die $FBPase_{tot}$ der Normalratte ergibt Identität auf dem 5 %-Niveau mit Ausnahme der $FBPase_{tot}$ der Hungerratte (1 %-Niveau).

Zusammenfassend lassen sich über das Zahlenmaterial aufgrund der Tests nach David, Bartlett, Dunnett und der Varianzanalyse folgende Aussagen treffen:

1. Weil die FBPase-Gesamtaktivität eine gute Übereinstimmung in allen Strukturen zwischen Normal- und Acidose-Kontrollratte zeigt, kann das Wirksamwerden entscheidender Einflüsse auf die FBPase durch Sondenfütterung, reine Glucoseernährung und Wegfall des gewohnten Futters ausgeschlossen werden. Ein signifikanter Unterschied in der FBPase-Gesamtaktivität zwischen Normal- und Acidose-

ratte muß also allein auf die acidotische Stoffwechsellage zurückgeführt werden. Für die Acidose-Kontrollratte wird deshalb eine Aufgliederung der FBPase-Gesamtaktivität in ihre Komponenten spezifische und unspezifische FBPase nicht vorgenommen.

2. Anhand der Stichproben läßt sich eine signifikante Stimulation der FBPase-Gesamtaktivität durch Hunger und Acidose für alle Strukturen ausschließen mit Ausnahme für PCTs, in denen 48h-Fasten eine Stimulation um 40 % der Basisaktivität bewirkt, 48h-Acidosefütterung eine Stimulation um 60 %.
3. Die nicht AMP-hemmbare FBPase-Restaktivität zeichnet sich aus durch gute Übereinstimmung der drei Fütterungszustände in allen Strukturen.
4. Die Identität der FBPase-Gesamt- und -Restaktivität in G, DCT und CD läßt die berechneten geringen spezifischen FBPase-Aktivitäten (als Differenz D von FBPase-Gesamt- und -Restaktivität, Tab. 3) in diesen Strukturen mit den genannten Irrtumswahrscheinlichkeiten als Artefakt erscheinen.

Läßt sich das Ergebnis der Stimulation der FBPase-Gesamtaktivität im PCT auf die spezifische FBPase-Aktivität übertragen? Um diese Frage zu beantworten, wurde für die 3 Strukturen mit nachgewiesener spezifischer FBPase-Aktivität - PCT, PST und TAL - je ein Vergleich der spezifischen Aktivität jeder Struktur zwischen Hunger- und Normalratte und zwischen Acidose- und Normalratte durchgeführt (Erweiterung des Prüfquotienten gemäß t-Test nach einer persönlichen Mitteilung von K. Dietz)

Prüfquotient:

$$t = \frac{\left(\bar{x}^{N}_{tot} - \bar{x}^{N}_{AMP}\right) - \left(\bar{x}^{i}_{tot} - \bar{x}^{i}_{AMP}\right)}{\sqrt{\frac{s^{N\,2}_{tot}}{n^{N}_{tot}} + \frac{s^{N\,2}_{AMP}}{n^{N}_{AMP}} + \frac{s^{i\,2}_{tot}}{n^{i}_{tot}} + \frac{s^{i\,2}_{AMP}}{n^{i}_{AMP}}}}$$

Freiheitsgrade:

$$f = \frac{\frac{s^{N\,2}_{tot}}{n^{N}_{tot}} + \frac{s^{N\,2}_{AMP}}{n^{N}_{AMP}} + \frac{s^{i\,2}_{tot}}{n^{i}_{tot}} + \frac{s^{i\,2}_{AMP}}{n^{i}_{AMP}}}{\frac{\left(\frac{s^{N\,2}_{tot}}{n^{N}_{tot}}\right)^2}{n^{N}_{tot}+1} + \frac{\left(\frac{s^{N\,2}_{AMP}}{n^{N}_{AMP}}\right)^2}{n^{N}_{AMP}+1} + \frac{\left(\frac{s^{i\,2}_{tot}}{n^{i}_{tot}}\right)^2}{n^{i}_{tot}+1} + \frac{\left(\frac{s^{i\,2}_{AMP}}{n^{i}_{AMP}}\right)^2}{n^{i}_{AMP}+1}} - 4 \leq n^{N}_{tot}+n^{N}_{AMP}+n^{i}_{tot}+n^{i}_{AMP}-4$$

$\cdot$ ($p^{N/i}_{D}$, Tab. 6)

Eine signifikante Stimulation der spezifischen FBPase liegt hiernach im PCT für Hunger und Acidosefütterung vor, nicht aber im PST und TAL, d.h. das Ergebnis des t-Tests zur spezifischen FBPase-Aktivität entspricht dem Ergebnis von Varianzanalyse und Dunett-Test zur FBPase-Gesamtaktivität.

Obwohl durch Errechnung der spezifischen FBPase-Aktivität störende Überlagerungen vom erwarteten Angriffspunkt der Regelmechanismen abgetrennt wurden, können die Aussagen über die spezifische FBPase nicht mit höherer statistischer Wahrscheinlichkeit getroffen werden als bei der FBPase-Gesamtaktivität, weil sich die Standardfehler bei Subtraktion von Mittelwerten vergrößern:

$$\text{z.B.: } \bar{x}^{A}_{tot} \pm s_{\bar{x}^{A}_{tot}} \;;\; \bar{x}^{A}_{AMP} \pm s_{\bar{x}^{A}_{AMP}} \rightarrow \bar{x}^{A}_{tot} - \bar{x}^{A}_{AMP} \pm \sqrt{s_{\bar{x}^{A}_{tot}}^{2} + s_{\bar{x}^{A}_{AMP}}^{2}}$$

147,8±11,6; 21,1±2,9; 136,2±12,0

Von Seiten der statistischen Auswertung wäre die Gewinnung abhängiger Stichproben zur FBPase-Gesamt- und -Restaktivität wünschenswert. Um bei den gepoolten Strukturen mit geringer FBPase-Aktivität gleichzeitig $FBPase_{tot}$ und $FBPase_{AMP}$ zu bestimmen, müßte jede Struktur korrekt halbiert und in

die Pools zur $FBPase_{tot}$- und $FBPase_{AMP}$-Analyse aufgeteilt werden. Dies Vorgehen erfordert neben einer außerordentlichen Fingerfertigkeit auch eine Waage für den Bereich 0,5 - 10 ng.

Punkt 5 der Zusammenfassung unserer Ergebnisse:

5. Eine signifikante Stimulation der spezifischen FBPase-Aktivität durch Hunger und Acidose findet nur im PCT statt.

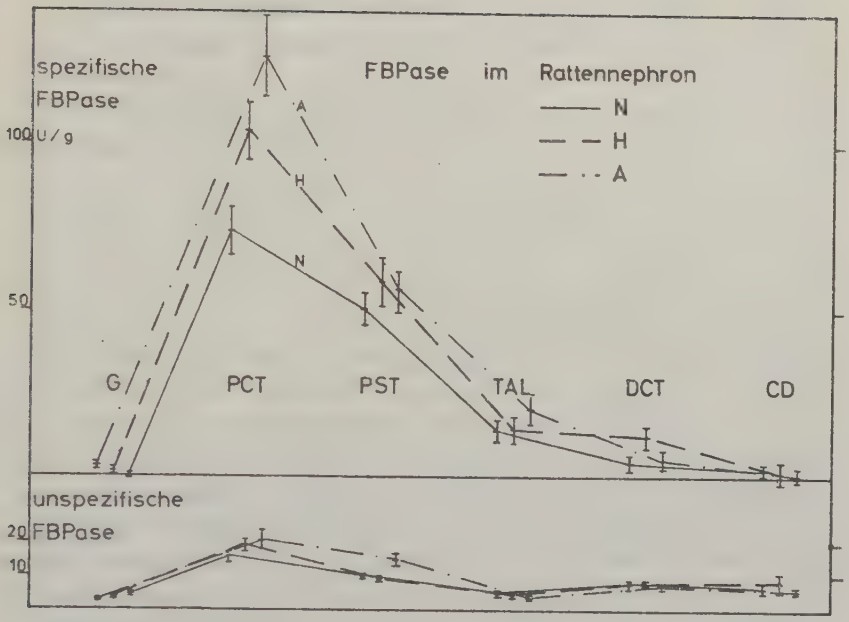


Abb. 4: FBPase (U/g Trockengewicht) im Rattennephron

Spezifische und unspezifische FBPase (aus Tab. 5 und 6) der Normalratte (N), 48h-Hungerratte (H) und 48h-Acidoseratte (A) in 6 Strukturen des Rattennephrons.

Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwerts

FBPase-Aktivität / Tubuluslänge

Die sich bei der Burg-Technik (9) als Bezugswert anbietende Tubuluslänge ist zwar in der Lowry-Technik dem Trockengewicht in dieser Funktion, was die Streuung der Werte angeht, unterlegen, für grobe Vergleiche mit physiologischen Daten aber durchaus von Interesse. Deshalb wurde die Längsachse der dissezierten Tubuli mit einem Maßstab im Okular vermessen und ohne Streichung von Ausreißern für alle in die Berechnung der FBPase-Aktivität / Trockengewicht aufgenommenen Werte eine Kalkulation der FBPase-Aktivität / Länge des dissezierten Tubulusschnitts in µU/mm vorgenommen, soweit eine Längenmessung vorlag (Tab. 7). Nimmt man einen Standardtubulus von 30 µm Durchmesser an, aus dem die 16 µm dicke Scheibe des Nierenschnitts in Längsrichtung disseziert wurde, so läßt sich die Aktivität des intakten, lyophilisierten Tubulus / Länge durch Multiplikation mit dem Faktor 1,5 aus der Aktivität des Tubulusschnitts / Länge abschätzen. Die durch Lyophilisierung bedingte Schrumpfung des Tubulus wird für das Kaninchennephron mit 35 % angegeben (86). Beide Faktoren zusammen heben sich auf, sodaß die berechnete FBPase-Aktivität / Länge des lyophilisierten, dissezierten Tubulusschnitts der FBPase-Aktivität / Tubuluslänge in vivo entspricht. Tab. 7 zeigt analog zu den FBPase-Aktivitäten / Trockengewicht in Tab. 4 - 6 die Aktivitäten / Tubuluslänge ohne eine statistische Auswertung.

Tab. 7: FBPase-Aktivität / Tubuluslänge

Stru	Füt	$\bar{y}_{tot}$	m_{tot}	t_{tot}	S_{tot}	$\bar{y}_{AMP}$	m_{AMP}	t_{AMP}	S_{AMP}	E
PCT	N	18,9	17	7,1	22,0	2,7	20	0,9	3,3	16,2
	H	20,9	10	6,2	21,8	3,6	8	1,1	3,3	17,3
	A	27,2	13	8,1	24,4	4,0	8	1,2	2,9	23,2
PST	N	11,6	12	3,9	11,3	2,1	8	0,8	1,9	9,5
	H	12,6	9	8,0	26,0	1,6	7	0,6	1,6	11,0
	A	13,8	10	5,7	17,0	2,9	8	1,3	3,4	10,9
TAL	N	2,1	11	1,5	4,0	0,5	9	0,3	0,9	1,6
	H	1,6	5	1,1	2,1	0,4	9	0,2	0,6	1,2
	A	1,8	10	0,7	2,2	0,3	7	0,2	0,5	1,5
DCT	N	1,3	8	0,7	2,0	0,7	5	0,3	0,6	0,6
	H	1,6	6	0,8	2,0	0,9	5	0,2	0,4	0,7
	A	1,4	8	0,8	2,3	0,6	6	0,3	0,6	0,8
CD	N	0,9	3	0,3	0,5	0,6	6	0,2	0,5	0,3
	H	0,6	3	0,3	0,5	1,0	2	0,6	0,8	-0,4
	A	0,7	5	0,4	1,0	0,4	5	0,1	0,3	0,3

Stru Struktur
Füt Fütterungszustand
tot FBPase-Gesamtaktivität in 10^{-6}U/mm lyophilisierter, dissezierter Tubulus
AMP FBPase-Restaktivität in 10^{-6}U/mm Tubulus
E spezifische FBPase-Aktivität in 10^{-6}U/mm Tubulus
$\bar{y}$ Mittelwert
m Zahl der Bestimmungen
t Standardabweichung
S Spannweite
N Normalratte Futter ad libitum
H Hungerratte 48h Fasten
A Acidoseratte 48h Acidosefütterung

D I S K U S S I O N DER M E T H O D E N

Abhängigkeit von Versuchstag und Versuchstier

Die Fütterung der Ratten erfolgte in 3 simultanen Vierergruppen (N, H, A und K). Aus Vorversuchen wurden in die Auswertung mit aufgenommen die Messungen an zwei Normal- und einer 48h-Hungerratte. Die FBPase-Gesamt- und FBPase-Restaktivität sind an denselben Tieren bestimmt, die FBPase-Restaktivität aber nur an 2 Normal-, 2 Acidose- und 3 Hungerratten.
Zur Ermittlung mittlerer tendenzieller Abweichungen in Abhängigkeit von Versuchstag bzw. Versuchstier wurden am Beispiel der Normalratten, die das inhomogenste Zahlenmaterial bieten, folgende Prüfquotienten gebildet:

$$v = \frac{\sum_k \left(n_{ik} \frac{\bar{x}_{ik} - \bar{x}_k}{s_k} \right)}{\sum_k n_{ik}} \quad \text{und} \quad w = \frac{\sum_k \left(n_{1k} \frac{\bar{x}_{1k} - \bar{x}_k}{s_k} \right)}{\sum_k n_{1k}}$$

v Prüfquotient Versuchstag
w Prüfquotient Versuchstier
n_{ik} Zahl der Bestimmungen am i-ten Versuchstag zur k-ten Struktur
n_{1k} Zahl der Bestimmungen am 1-ten Versuchstier zur k-ten Struktur
$\bar{x}_{ik}$ Mittelwert der Bestimmungen am i-ten Versuchstag zur k-ten Struktur (U/g)
$\bar{x}_{1k}$ Mittelwert der Bestimmung am 1-ten Versuchstier zur k-ten Struktur (U/g)
$\bar{x}_k$ Mittelwert aller Bestimmungen zur k-ten Struktur (U/g)
s_k Standardabweichung aller Bestimmungen zur k-ten Struktur (U/g)

Versuchstag	Versuchstier	Prüfquotient
Nr. 1	Nr. 1	v = 0,18
2	1	0,02
4	3 und 4	-0,26
10	8	0,59
12	12	-0,51
16	12	-0,06
18	8	-0,42

$\overline{|v|} \pm s_{|v|} = 0,29 \pm 0,22$

Versuchstier	Körpergewicht (g)	Prüfquotient w
Nr. 1	$h_1 = 190$	$w_1 = 0,15$
3	$h_3 = 345$	$w_3 = -0,35$
4	$h_4 = 360$	$w_4 = -0,20$
8	$h_8 = 245$	$w_8 = 0,45$
12	$h_{12} = 203$	$w_{12} = -0,40$
Mittelwert	$\bar{h} = 269$	$\bar{w} = 0,09$
		$\overline{\|w\|} = 0,31$
Standardabweichung	$s_h = 79$	$s_w = 0,36$
		$s_{\|w\|} = 0,14$

Die Messungen zeigen für den einzelnen Versuchstag und für das einzelne Versuchstier eine gemeinsame Tendenz, den endgültigen Mittelwert in allen Strukturen um 30 % der Standardabweichung der jeweiligen Struktur zu über- bzw. unterschreiten.

Daß die erheblichen Unterschiede im Körpergewicht der Normalratten ohne Einfluß auf die FBPase-Aktivität sind, macht eine Korrelationsanalyse (h / w) deutlich:

Regressionsgeraden: $\hat{w} = 0,34 - 0,00155\ \hat{h}$

$\hat{h} = 263 - 74,97\ \hat{w}$

$$r = \sqrt{b_{wh} \cdot b_{hw}} = 0,34$$

$$\hat{t} = \frac{r \cdot \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = 0,63 < t_{3;0,50}$$

Der zweiseitige t-Test (78) macht eine Korrelation Körpergewicht - FBPase-Aktivität unwahrscheinlich.
Nach den Erfahrungen der Nierenphysiologie und -biochemie sind Ergebnisse auch bei erheblichen Gewichtsunterschieden der benutzten Versuchsratten vergleichbar. Die in der Diskussion der Ergebnisse zitierten Autoren benutzten Ratten von 120 g - 200 g (55,56) bis zu einem mittleren Rattengewicht von 360 g (2).

Spezifität der FBPase-Methode

Im Photometerversuch erweist sich die FBPase-Methode ohne NADPH-cycling als linear mit der Zeit bis zu 45 Minuten bei Einsetzen von Homogenatskonzentrationen zwischen 12,5 und 200 ng Frischgewicht/µl (entspricht 45 bis 720 ng Trockengewicht/µl).
Ebenso konnte eine Linearität der Reaktion mit der Homogenatskonzentration gesichert werden für den Bereich zwischen 2,5 und 40 ng Frischgewicht/µl (entspricht 9 bis 140 ng Trockengewicht/µl) (Mall, A. & Schmid, H., pers. Mitteilung). Wie Abb. 5 zeigt, lassen sich mit der benutzten FBPase-Methode bei Einsatz des NADPH-cycling im Bereich der dissezierten Gewebsmengen (zwischen 5 und 50 ng) Aktivitäten messen, die weitgehend unabhängig sind von der Masse der Gewebsprobe. Während für PCT und PST aufgrund der hohen Aktivität in diesen Strukturen einzelne Nephronstücke von beliebigem Gewicht eingesetzt wurden, mußten für die 4 anderen Strukturen im allgemeinen 2 oder mehr einzeln gewogene Gewebsproben im Inkubat I gepoolt werden.
Inwieweit verfälschen andere Enzymaktivitäten und Substratkonzentrationen des Gewebes die wahre FBPase-Aktivität? Die hohe Spezifität der Methode wird erzielt durch

1. die Messung der F6P-Konzentration, welche sich im Vergleich zu den Konzentrationen von Substrat und zweitem Produkt der FBPase-Reaktion - FBP und Phosphat - als spezifischer erweist,

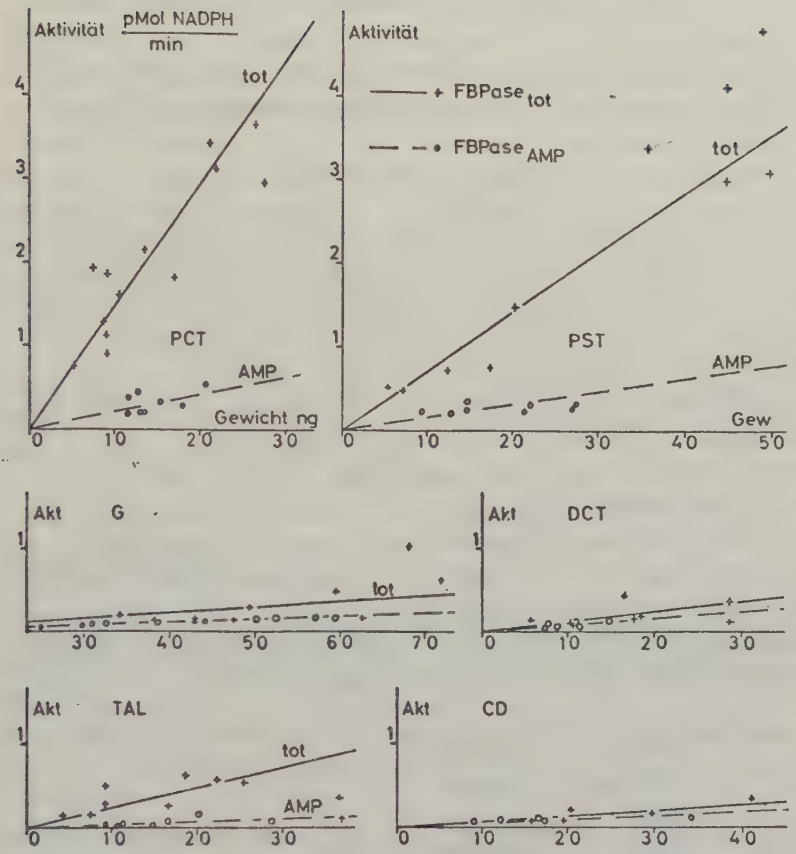


Abb. 5: Gewebsabhängigkeit der FBPase-Aktivität

Darstellung der Beziehung zwischen eingesetztem Gewebsgewicht (= Gew in ng Trockengewicht: Abszisse) und gemessener FBPase-Aktivität (= Akt in $\frac{\text{pMol NADPH}}{\text{min}}$: Ordinate) am Beispiel aller Messungen der FBPase-Gesamtaktivität (= tot: Kreuze) und FBPase-Restaktivität bei AMP-Hemmung (= AMP: Kreise) der 48h-Acidoseratte für alle 6 Nephronstrukturen. Die Diagramme fassen die an 6 Versuchstagen und 3 Ratten gewonnenen Ergebnisse zusammen.

2. die Optimierung von Substratkonzentrationen und pH-Wert und
3. das Einsetzen von Hilfsenzymaktivitäten von etwa 10^{-3} U im Inkubat I bei Gewebsenzymaktivitäten um 10^{-6} U im selben Inkubat.
   (Mall, A. & H. Schmid, persönliche Mitteilung)

Bei der Übertragung der Messungen auf die Verhältnisse in vivo - speziell bei der Kalkulierung von theoretisch maximalen futile-cycling-Raten im Abschnitt Diskussion der Ergebnisse - ist zu beachten, daß die Aktivitäten unter optimierten Bedingungen gemessen wurden. Es scheint z.B. fraglich, ob die erhebliche Aktivitätssteigerung durch Mercaptoäthanol im Test ein Korrelat in vivo hat.
Ein reproduzierbarer, geringgradiger Knick in den Kurven der FBPase-Kinetik wird gedeutet als das Wirksamwerden der gewebseigenen Phosphogluconatdehydrogenase (6PGDH, EC 1.1.1.44), nachdem ihr Substrat in genügendem Maße gebildet ist. Die Anwesenheit dieses Enzyms täuscht eine höhere FBPase-Aktivität vor, indem zusätzlich zum NADPH der G6PDH-Reaktion $NADP^+$ reduziert wird (siehe Abb. 6):

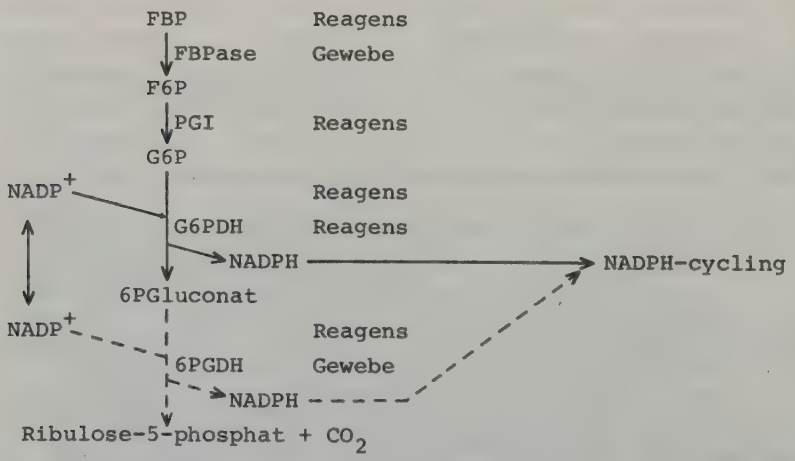


Abb. 6: Störung des FBPase-Tests durch gewebseigene Phosphogluconatdehydrogenase (6PGDH)

Im Leberhomogenat, in dem sich die optimalen Absolutaktivitäten FBPase : 6PGDH verhalten wie 2 : 1 kann dieser Fehler unter den hier verwendeten Reaktionsbedingungen bis zu 10 % des Meßwertes betragen (Mall, A. & H. Schmid, persönliche Mitteilung). In unseren Messungen der FBPase-Aktivität in der Niere wurde er vernachlässigt (Aktivitätsverhältnis FBPase : 6PGDH = 8 : 1 im Nierenhomogenat nach 98). Ein signifikanter futile cycle FBPase/PFK im Ansatz ist aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der Enzyme im Nephron für die Messungen der FBPase-Aktivität in Einzelstrukturen auszuschließen (siehe Diskussion). Nach unseren experimentellen Erfahrungen und den aufgeführten theoretischen Überlegungen kann auf das Anfertigen von Gewebsleerwerten verzichtet werden.

Fehlerabschätzung

Nach dem Potenzproduktgesetz der Fehlerfortpflanzung entsteht bei der Berechnung der Aktivität / Trockengewicht (A) aus

p = Fluorimeterskalenteile der Probe minus Fluorimeterskalenteile des Leerwerts

f = Faktor

m = Gewicht der Probe

nach der Formel $A = p\ f\ m^{-1}$ ein mittlerer relativer Fehler der Aktivität von

$$\frac{s_{\bar{A}}}{\bar{A}} = \sqrt{\left(\frac{s_{\bar{p}}}{\bar{p}}\right)^2 + \left(\frac{s_{\bar{f}}}{\bar{f}}\right)^2 + \left(\frac{s_{\bar{m}}}{\bar{m}}\right)^2}$$

Da aus methodischen Gründen Doppelbestimmungen zu Gewebsproben nicht möglich sind, wird als Schätzgröße für "Skalenteile Probe minus Skalenteile Leerwert" gewählt: "Skalenteile Standard minus Skalenteile Leerwert". Diese an jedem Versuchstag in Doppelbestimmungen für 3 im Konzentrationsbereich der Gewebsmessungen liegende Standards be-

stimmte Größe zeigt einen relativen Fehler für
Standard a minus Leerwert $s_{\bar{a}}/\bar{a}$ = 0,03
Standard b minus Leerwert $s_{\bar{b}}/\bar{b}$ = 0,05
Standard c minus Leerwert $s_{\bar{c}}/\bar{c}$ = 0,06.
Entsprechend ist der Mittelwert des Faktors bei Berechnung aus den Messungen zu den 3 Standards mit einem mittleren relativen Fehler von $s_{\bar{f}}/\bar{f}$ = 0,05 behaftet. Die Wägungen sind auf 1 Skalenteil im Okular reproduzierbar. Der mittlere relative Fehler beträgt bei

3 ng	$s_{\bar{m}}/\bar{m}$ =	0,12
5 ng		0,08
10 ng		0,04.

Eingesetzt wurden als kleinste ungepoolte Proben (PCT) 5 ng, als kleinste gepoolte Proben (DCT) 15 ng. Bei einer ungepoolten Probe mit Gewebsgewicht um 5 ng beträgt also der mittlere relative Fehler der Aktivität / Trockengewicht:

$$s_{\bar{A}}/\bar{A} = \sqrt{0{,}06^2 + 0{,}05^2 + 0{,}08^2} = 0{,}11.$$

Er erhöht sich noch bei gepoolten Proben und ist durch Dissektion großer Stücke erheblich zu vermindern.

Längenmessung

Die Methode der Längenmessung des Tubulus im Okular ist für scharfe Vergleiche nicht geeignet, weil

1. je nach Lage des Schnitts in der Breite stark variierende Tubulusscheiben disseziert wurden,
2. die Tubuli sich bei der Messung einrollten und durch elektrostatische Aufladung aufstellten,
3. bei partes convolutae die Längsachse nur geschätzt und nicht auf Fotografien entlang ihrer Biegung vermessen wurde und
4. DCTs meist nicht als Längs-, sondern als Querschnitt disseziert wurden.

So ergibt der Bezug auf die Tubuluslänge einen um 10 % größeren Variationskoeffizienten und läßt im Unterschied

zum Bezug auf das Tubulusgewicht für die FBPase-Gesamt- und spezifische FBPase-Aktivität im PCT zwischen Normal- und Hungerratte keinen signifikanten Unterschied erkennen, sondern nur zwischen Normal- und Acidoseratte.

D I S K U S S I O N DER E R G E B N I S S E

FBPase im Homogenat der Normalratte

Wo nicht gesondert auf die untersuchte Spezies hingewiesen wird, sind die im folgenden zitierten Enzymaktivitäten das Ergebnis von Untersuchungen an Ratten. In Einzelfällen muß auf Experimente an anderen Tieren zurückgegriffen werden, die aufgrund der in der Nierenbiochemie bekannten Speziesunterschiede nur mit größter Vorsicht behandelt werden dürfen (siehe 30,36).

Zum Zweck der Vergleichbarkeit werden alle Werte mit folgenden Faktoren in die gemeinsame Einheit U/g Trockengewicht umgerechnet:

MKH (= Mol/kg x h)	x 16,7 →	U/g Trockengewicht
U/g Frischgewicht	x 3,6 →	U/g Trockengewicht (90)
U/g Protein	x 0,6 →	U/g Trockengewicht (48)
U/g Protein	x 0,17 →	U/g Frischgewicht (2,8,90).

Die Kalkulation von Enzymaktivitäten im Nierengesamthomogenat aus denen im Cortex- oder Medullahomogenat und umgekehrt erscheint nicht sinnvoll, weil die Enzymaktivitäten der Niere nur indirekt eine Funktion der histologischen Schicht, vielmehr aber direkt eine Funktion des Nephronabschnitts sind. So sind auch die Messungen der FBPase-Aktivität aus Vorversuchen in homogenisierten Nierenschnitten mit nicht identischer Cortex/Medulla-Relation nur als Richtwerte zu verstehen, weil sie nicht im Homogenat des Gesamtorgans oder eines repräsentativen Querschnitts gewonnen wurden. Im Homogenat zeigen etwa 10 % der gemessenen FBPase-Gesamtaktivität nicht die für FBPase spezifische AMP-Hemmung (95) und sind deshalb vom ursprünglich gewonnenen Wert zu subtrahieren, womit sich die spezifische FBPase-Aktivität auf etwa 30 U/g Trockengewicht berechnet. Das entspricht den Ergebnissen von Heinz (35): 8,2 U/g Frischgewicht im Rattennierenhomogenat (= 30 U/g Trockengewicht) und Longshaw et al. (55,56): 11,9 U/g Frischgewicht (= 43 U/g Trok-

kengewicht). Weber (98) fand eine etwas geringere Aktivität: 13,8 bis 17,7 U/10^9 mittlere Nierenzellen (= 14 bis 20 U/g Trockengewicht). Die Mehrzahl der Publikationen beschreibt Aktivitätsbestimmungen gluconeogenetischer Enzyme im Cortexhomogenat, weil in Ermangelung einer diffizileren Technik der gesamte Cortex als Organ der Gluconeogenese betrachtet wird, so für die FBPase Scrutton & Utter (90): 17 U/g Cortexfrischgewicht (= 61 U/g Cortextrockengewicht) (Das Material ist nicht explizit definiert. Im Text wird aber Bezug auf den Nierencortex genommen.) und Anderson & Stowring (2): 93 U/g Protein im Cortex (= 56 U/g Cortextrockengewicht).

Gluconeogenese im Nierenhomogenat

Nach der bottleneck-Theorie zeichnen sich regulatorische Enzyme im Stoffwechselweg durch geringe Enzymaktivität aus. Vergleicht man alle Enzymaktivitäten der Gluconeogenese in der Rattenniere, wie sie von Scrutton & Utter (90) angegeben werden, so zeigt sich, daß die FBPase aufgrund ihrer relativ hohen Aktivität (61 U/g Trockengewicht) hinter Pyruvatcarboxylase (21 U/g), PEPCK (24 U/g), Fructosebisphosphataldolase (!) (36 U/g) und Glucose-6-phosphatase (47 U/g) als Kandidat für regulatorische Funktionen rangiert. In derselben Arbeit werden die bidirektionalen Enzyme der Glykolyse und Gluconeogenese mit 200 bis 800 U/g Trockengewicht ausgewiesen. Nach einer Publikation von Anderson & Stowring (2) sind die Aktivitäten im Rattencortexhomogenat in umgekehrter Reihenfolge zu ordnen: Pyruvatcarboxylase 147 U/g Protein (= 88 U/g Trockengewicht), PEPCK 113 U/g Protein (= 68 U/g Trockengewicht) und FBPase 93 U/g Protein (= 56 U/g Trockengewicht). In zwei Arbeiten, die nur ausgewählte Enzyme aus dem Spektrum der Gluconeogenese behandeln, finden sich die folgenden Aktivitätsangaben: Burch et al. (8) Fructosebisphosphataldolase 65 U/g Trokkengewicht, G6Pase 40 U/g Trockengewicht bei Aktivitäten

bidirektionaler Enzyme von 530 U/g Trockengewicht: Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase bis 11900 U/g Trockengewicht: Triosephosphatisomerase und Longshaw (55,56) FBPase 11,9 U/g Frischgewicht (= 43 U/g Trockengewicht), PEPCK 7,4 U/g Frischgewicht (= 27 U/g Trockengewicht) und G6Pase 4,2 U/g Frischgewicht (= 15 U/g Trockengewicht). Die Skala der testabhängigen absoluten Aktivitäten scheint nicht so wichtig wie ihre Größenordnung, welche die Enzyme grob in zwei Gruppen aufspaltet. Zur Frage des PEPCK-Absolutwertes bestehen aber erhebliche Differenzen in der Literatur. Die im folgenden in den Vergleichen der Einzelstrukturen zitierte Arbeit (Guder & Schmidt, 31) beschreibt für das Cortexhomogenat eine PEPCK-Aktivität von nur 1,6 U/g Protein (= 1 U/g Trockengewicht). Auch das schließt eine regulatorische Funktion der FBPase nicht aus, wie sie durch die Vielzahl der aus in vitro Experimenten beschriebenen Regulatoren (69,70) nahegelegt wird.
Für das einzige bidirektionale Enzym mit niedriger Aktivität im Homogenat, die Fructosebisphosphataldolase (EC 4.1.2.13) werden Isoenzyme mit stoffwechselspezifischem Verteilungsmuster beschrieben (vergleiche die Ausführungen zum Schmidtschen Modell des Kohlenhydratstoffwechsels im Nephron in der "Einleitung"): Das "glykolytische" Aldolase-Isoenzym A mit der höchsten FBP-Spaltungs-Aktivität und dem höchsten FBP-Spaltungs-/FBP-Synthese-Quotienten (68) ist immunhistochemisch in distalen Nephronstrukturen nachgewiesen, das "gluconeogenetische" Aldolase-Isoenzym B, für das beide Maßzahlen kleiner ausfallen, ist (ebenfalls mit der MAGIC-Technik = mixed aggregation immuno-cytochemical technique) im proximalen Convolut lokalisiert (97). Die Immunhistochemie stellt für die Fructosebisphosphataldolase-Isoenzyme sehr anschaulich eine biochemische Topographie der Niere dar, erlaubt aber nur qualitative Aussagen. Es ist nicht auszuschließen, daß die Methoden der quantitativen Histochemie, mit denen in der vorliegenden Arbeit das Verteilungsmuster der FBPase im Nephron vermessen wird, auch auf die Aldolase-Isoenzyme anwendbar sind, weil für das En-

zympaar Aldolase A/B ein dem Paar PFK/FBPase analoges Regulationsverhalten beschrieben ist (59): Aldolase A wird durch ATP, Aldolase B durch AMP gehemmt.

FBPase im Nephron der Normalratte

Unter der Voraussetzung, daß für die PEPCK der Acidosekontrollratte wie für die FBPase im identischen Fütterungszustand keine signifikanten Aktivitätsunterschiede gegenüber der normalen Fütterung im Rattennephron bestehen, wird im folgenden das Aktivitätsprofil der PEPCK im Rattennephron unter Acidosekontrollfütterung (32 - leider enthält die Arbeit keine Angaben zur PEPCK bei normaler Fütterung) mit dem der spezifischen FBPase unter normaler Fütterung verglichen. Weil die Differenzierung der PEPCK-Aktivitäten von subcapsulärem und juxtamedullären Nephron im PCT und PST der Kontrollratte keine signifikanten Unterschiede ergibt und in der vorliegenden Arbeit diese Auftrennung für die FBPase nicht vorgenommen wurde, sind die PEPCK-Aktivitäten zum Mittelwert zusammengefaßt:

Tab. 8: FBPase und PEPCK im Nephron der Normalratte

Struk.	PEPCK der Kontrollrat. U/g	% des PCT-Wertes	FBPase Normalrat. U/g	% des PCT	$\log \frac{\text{FBPase}}{\text{PEPCK}}$
G	n.s.	0	n.s.	0	-
PCT	2,71	100	74,0	100	1,44
PST	1,41	52	50,8	69	1,56
TAL	(0,32 -n.s.)[+)]	(12)	14,1	19	(1,64)
DCT,CD	n.s.	0	n.s.	0	-

[+)] PEPCK-Absolutaktivitäten unterscheiden sich im TAL nicht signifikant (n.s.) vom Nullwert.

Aufgrund der sich für beide Enzyme im PCT, PST und TAL ergebenden konstanten Proportionen (Abb. 7) erfährt die von

Guder und Schmidt (31) als fraglich signifikant diskutierte PEPCK-Aktivität im TAL eine Aufwertung, zumal sie dasselbe Stimulationsverhalten bei Acidose (s.u.) zeigt wie die FBPase.
Es bestehen keine experimentellen Hinweise darauf, daß die Glucose-6-phosphatase, welche den 3. unidirektionalen und einem futile-cyclus zugehörigen Schritt der Gluconeogenese katalysiert, ein ähnliches renales Aktivitätsmuster zeigt, wie die proportionskonstante PEPCK-FBPase-Gruppe: Bonting et al. (7) beschreiben eine gleichmäßige Verteilung des Enzyms beim Menschen mit etwas geringeren Aktivitäten im Glomerulus, Henle'scher Schleife und Sammelrohr. Trotz Fastens, d.h. Gluconeogenesestimulation, fand McCann (60) in der Hundeniere eine Gleichverteilung der Glucose-6-phosphatase mit höheren Konzentrationen in den Strukturen des Markstrahls. In beiden Arbeiten wurde die G6Pase-Aktivität zum Teil nur für Nierenzonen bestimmt. Rückschlüsse auf die Aktivitäten von Einzelstrukturen dieser Zonen scheinen gewagt, wenn man sich die hohen Aktivitätsunterschiede unmittelbar benachbarter Nephronstrukturen vor Augen führt, wie sie am Beispiel der FBPase in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden. Der histochemische G6Pase-Nachweis fällt nach Chiquoine (10) in der Mäuseniere stark positiv aus im proximalen Convolut und im parietalen Blatt der Bowmanschen Kapsel, schwach positiv in der Henle'schen Schleife und negativ im distalen Convolut und Sammelrohr. Der Befund einer von den proximalen zu den distalen Strukturen zunehmenden G6Pase-Aktivität in der Rattenniere (88) muß kritisch gewertet werden, weil aufgrund geringer Spezifität der Methode die Phosphoglucoisomerase mitgemessen wurde (85).
Nach neueren Befunden, welche die ausschließliche Gluconeogenesefunktion der Glucose-6-phosphatase in Frage stellen (65), ist offen, ob das Enzym eher der der Pyruvatkinase-Hexokinase-Gruppe (85) oder der PEPCK-FBPase-Gruppe in seinem Verteilungsmuster gleicht. Aus dem multifunktionalen Verhalten des Enzyms ist im Hinblick auf das hohe

Glucoseangebot an die Nierenzelle (speziell postprandial und bei Diabetes) die Phosphotransferaseaktivität von besonderem Interesse, die für ein breites Spektrum von Substraten nachgewiesen ist (ATP, ADP, PP_i und Zuckerphosphate). Weist man der G6Pase nur die Funktion der Glucosefreisetzung zu, so läßt sich schwerlich erklären, warum die spezifische G6Pase-Aktivität der Rattenniere 74 % des Leberwertes beträgt (98), obwohl der renalen Glykogenolyse und Gluconeogenese nur eine untergeordnete Rolle in der Konstanthaltung des Blutglucosespiegels zukommt.

Tab. 9: G6Pase im Nephron von Mensch, Hund und Ratte

G6Pase U/g Trockengewicht		Bonting (7) Mensch	McCann (60) Hund(Fasten)	Schmidt (88) Ratte
G		4	-	17
PCT		18	43	15
PST	Markstrahl	18	70	23
TAL				38
DCT	äußeres	14	40	67
	Mark	5	-	
CD				151

Über eine mögliche Beteiligung der G6Pase am Fructose- und Glykogenstoffwechsel der Niere (15) bestehen noch keine quantitativ histochemischen Untersuchungen.

FBPase im Nephron der Hungerratte

Fasten führt bei der Ratte zu einer Stimulation
1. der Gluconeogeneserate in Cortexschnitten (51)
2. der renalen PEPCK-Aktivität (270 % des Kontrollwertes nach 24h Fasten im Cortexhomogenat) (31)
3. der renalen G6Pase-Aktivität (150 % des Kontrollwertes) (26).

Während im Homogenat aus den oben genannten Schwierigkei-

ten in den Vorversuchen zu dieser Arbeit eine Stimulation der renalen FBPase bei Hunger nicht gefunden wurde, konnte sie im microdissezierten Nephron für das proximale Convolut demonstriert werden. In Ermangelung einer Publikation, in der PEPCK-Aktivitäten einer 48h-Hungerratte mit denen einer normal gefütterten Ratte verglichen werden, wird die PEPCK im Nephron einer 24h-Hungerratte (31) mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten FBPase bei einer 48h-Hungerratte auf Beibehaltung der Proportionskonstanz der Enzyme unter Stimulation geprüft:

Tab. 10: FBPase und PEPCK im Nephron der Hungerratte

Struktur	PEPCK U/g 24h Hunger	FBPase U/g 48h Hunger	$\log \frac{\text{FBPase}}{\text{PEPCK}}$
G,DCT,CD	nicht signifikant		
PCT	3,97	104,1	1,42
PST	1,81	58,8	1,51
TAL	0,0067	14,4	2,33

Ein Verlauf der beiden Enzymaktivitäten während der Fastenperiode ist bisher nur am Kaninchennierenhomogenat gemessen worden (71). Während die PEPCK im gesamten Experiment einen stetigen Aktivitätsanstieg zeigt, geht der Stimulation der FBPase im Kaninchennierenhomogenat eine Phase des Aktivitätsabfalls voraus. Die in Tab. 10 verglichenen Messungen an Einzelstrukturen der Rattenniere sind jeweils im aufsteigenden Schenkel des Aktivitätsverlaufs lokalisiert. Zum Zeitpunkt der Messung sind beide Enzyme noch nicht maximal stimuliert, wenn sich die Befunde am Kaninchennierenhomogenat trotz Speziesdifferenz und Eigenarten der Einzelstrukturen auf die am Rattennephron übertragen lassen. Nach 48stündigem Fasten dürfte das Aktivitätsverhältnis durch eine weitere Stimulation der PEPCK zu ihren Gunsten verschoben sein. Anzustreben ist ein Vergleich der Aktivitätsverläufe von PEPCK und FBPase in Nephroneinzelstrukturen. Wie die Messungen der PEPCK zeigen, müssen beim Fasten

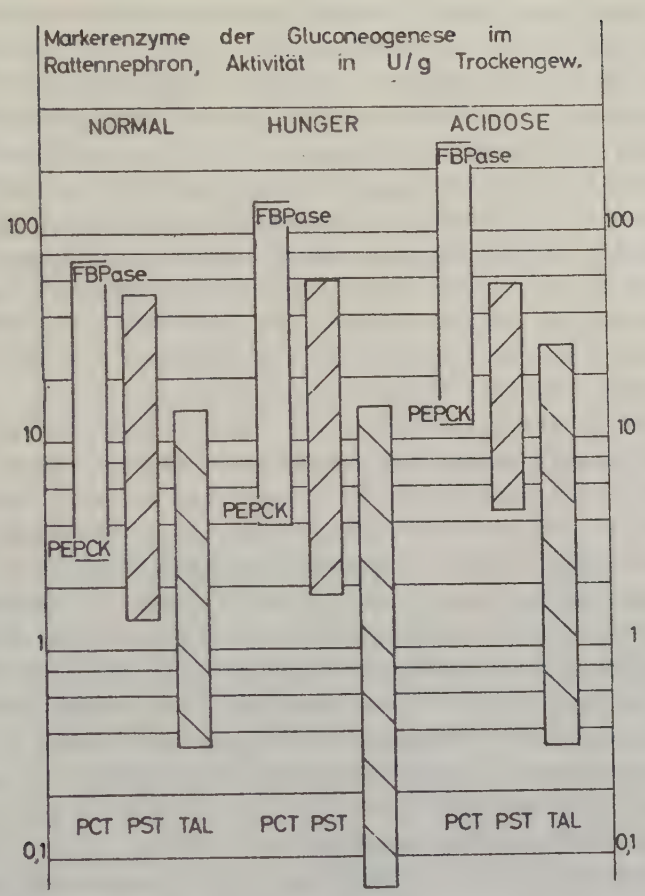


Abb. 7: Markerenzyme der Gluconeogenese im Rattennephron

Aktivitäten (Mittelwerte in U/g Trockengewicht) von spezifischer FBPase (Tab. 6) und PEPCK (Guder, W.G. & U. Schmidt, 31,32) der Normal-, Hunger- und Acidoseratte in den 3 Strukturen des Rattennephrons mit signifikanter gluconeogenetischer Aktivität. Darstellung der proportionskonstanten Gruppe aus Tab. 8, 10 und 11.

nämlich auch gegensinnige Beeinflussungen verschiedener Tubulusabschnitte in Betracht gezogen werden. Freilich ist die Hemmung der PEPCK-Aktivität im TAL trotz Stimulation der Gluconeogenese unter dem Aspekt methodischer Schwierigkeiten bei der Messung so geringer Aktivitäten zu beurteilen. (Normalratte 0,32 U/g, Hungerratte 0,067 U/g - beide Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant vom Nullwert!) Aufgrund der gegenüber der Normalratte unveränderten Proportionen der Enzyme im PCT und PST ist zumindest für diese Strukturen zu postulieren, daß im Hunger auf PEPCK- und spezifische FBPase-Aktivität gleichermaßen ein stimulativer Einfluß wirksam wird.
Von großem Interesse ist die Frage, ob Nordlies Experimente zur Glucose-6-phosphatase am Leberhomogenat (65) auf die Niere übertragbar sind. Er zeigte, daß die nach 48stündigem Fasten maximale Neusynthese hepatischer G6Pase ein Enzym mit überwiegender Gluconeogeneseaktivität bildet. Die Hemmung der glykolytischen Aktivität der G6Pase im Hunger wertet Nordlie als indirekten Beweis für die physiologische Relevanz der Glucose aufbauenden Aktivität: Läge nicht sogar bei vermindertem Blutglucosespiegel (im Hunger!) eine signifikante Phosphotransferaseaktivität vor, so bestünde keine Notwendigkeit, diese zu hemmen. Experimente zur Differenzierung der glykolytischen und gluconeogenetischen G6Pase-Aktivität im Nephron stehen noch aus.
Das PEPCK-FBPase-Profil am Nephron der Ratte unterscheidet sich von dem im Homogenat der Maus und des Kaninchens bei Fasten. Zorzoli & Li (100) geben nach 48h Fasten für den Mäusenierencortex bei einer Stimulation der PEPCK um 137 % Verminderungen der FBPase um 15 % und der G6Pase um 7 % (bezogen auf Frischgewicht) an, die mit dem gemessenen Proteinverlust korrelieren. Interessant ist die Verlaufsbeobachtung gluconeogenetischer Enzymaktivitäten beim Fasten in der Kaninchenniere (71): Bei einer stetig ansteigenden PEPCK-Aktivität zeigt die FBPase einen vorübergehenden Abfall in den ersten 36h, gefolgt von einer Stimulation, die nach 65h Fasten die Ausgangsaktivität überschreitet. Auch

im Verlauf der Aktivitätsabnahme wird die FBPase dabei verglichen mit der gleichzeitig gemessenen PEPCK nicht geschwindigkeitsbegrenzend für die Gluconeogenese. Die beobachteten Konzentrationsänderungen und Änderungen der molekularen Struktur der FBPase werden diskutiert im Zusammenhang mit der gesteigerten proteolytischen Aktivität im Hunger und der möglichen Existenz zweier Gene für die FBPase, von denen sich das eine bei normal gefütterten, das andere bei Hungertieren manifestiert.

FBPase im Nephron der Acidoseratte

Aufgrund erheblicher Speziesunterschiede im Acidosestoffwechsel der Niere (36) werden in diesem Kapitel nur Rattenexperimente zitiert.
Neben der Metabolisierung endogener Säuren speziell bei Hunger, Arbeit und Diabetes kommt der renalen Gluconeogenese auch eine nierenspezifische Funktion (1) bei der Regulation des Säuren-Basen-Haushalts zu, wie sie erstmals 1966 von Goodman et al. demonstriert wurde. Sie postulierten, daß die Umwandlung von αKetoglutarsäure in Glucose eine regulatorische Funktion auf die Ammoniakproduktion ausübt (siehe Abb. 2), indem sie den verminderten Glutamat-Spiegel in der Niere chronisch acidotischer Ratten mit der daraus resultierenden Aufhebung der Rückkopplungshemmung auf die Glutaminase auf eine Stimulation der Gluconeogenese zurückführten.
Diese Hypothese wird relativiert durch Experimente mit Nierenrindenschnitten (76,77,79), die eine Dissoziation von Ammoniakstoffwechsel und Gluconeogenese durch Stoffwechselinhibitoren und spezielle Inkubationsbedingungen beschreiben.
Tatsächlich wird bei der Acidose vermehrt Glutamin von der Niere aufgenommen und in einem höheren Prozentsatz (20 %) in Glucose umgewandelt, obwohl auch bei Acidose die Oxidation zu CO_2 überwiegt (43).

Unter der metabolischen Acidose durch NH_4Cl steigt die Gluconeogeneserate aus Glutamin, dem Hauptsubstrat der Ammoniaksynthese (in Nierenrindenschnitten auf 194 % des Kontrollwerts)-(43). Gleichzeitig ist auch die PEPCK-Aktivität stimuliert (auf 232 % der Kontrolle - (1); 225 % - (25); 220 % - (34); 335 % - (56), unter einer anderen Acidosefütterung - (55)). Im Gegensatz zu Flores & Alleyne (25) und Longshaw et al. (56), die bei metabolischer Acidose lediglich eine Stimulation der PEPCK, nicht aber der FBPase und G6Pase im Nierenhomogenat fanden, ergaben unsere Experimente eine erhöhte spezifische FBPase-Aktivität der Acidoseratte gegenüber der Acidosekontrollratte, was auch durch Metabolitenbestimmung in der acidotischen Rattenniere wahrscheinlich gemacht wurde (36). In den wohldefinierten Nephroneinzelstrukturen zeigt sich dieser Einfluß nur signifikant für das PCT. Einen Vergleich der Aktivitäten von spezifischer FBPase und PEPCK (32) im Nephron der 48h-Acidoseratte zeigt Tab. 11.

Tab. 11: FBPase und PEPCK im Nephron der 48h-Acidoseratte

Struktur	PEPCK		FBPase		$\log\frac{\text{FBPase}}{\text{PEPCK}}$
	U/g	%der Kontr.	U/g	%der Kontr.	
G,DCT,CD	nicht signifik.		nicht signifik.		-
PCT	10,17	375	126,7	171	1,10
PST	4,53	321	55,8	110	1,09
TAL	(0,33 -n.s.)+	(103)	20,8	(148 -n.s.)x	(1,80)

+) PEPCK-Absolutaktivitäten unterscheiden sich im TAL nicht signifikant vom Nullwert

x) keine signifikante Stimulation gegenüber der Kontrolle

Die Tabelle zeigt, daß im Unterschied zur FBPase die PEPCK bei Acidose nicht nur im PCT, sondern auch im PST stimuliert ist, insgesamt in weit größerem Maße als die FBPase. Das Verhältnis der Enzymaktivitäten ist im proximalen Tubulus

zugunsten der PEPCK verschoben, ohne daß sich die für PCT und PST berechneten Proportionen voneinander unterscheiden. Die numerische Angabe der Stimulation der FBPase im TAL durch Acidose-fütterung auf 148 % gegenüber der Kontrolle darf nicht über den varianzanalytischen Befund der Identität der Aktivitäten aller Fütterungszustände im TAL (siehe Ergebnisse) hinwegtäuschen, der sehr gut mit der fehlenden Stimulation der PEPCK im TAL bei Acidose übereinstimmt.

Weder die hepatische noch die renale Glucose-6-phosphatase erfahren bei 48h-Acidose eine Stimulation (1,25,56). Zumindest für die Leber-G6Pase gilt aber, daß im sauren Milieu die Hydrolaseaktivität gehemmt, die Phosphotransferaseaktivität massiv stimuliert wird (65).
Obwohl das gesamte Rattennephron die Fähigkeit zur Ammoniaksekretion hat, findet die Ammoniaksynthese nach Micropunktionsexperimenten bei ausgeglichener und acidotischer Stoffwechsellage zu 50 % im proximalen Tubulus statt (28). Dabei ist die maximale Glutaminaseaktivität nicht im PCT lokalisiert (etwa 30 U/g Trockengewicht), sondern gleichmäßig verteilt über PST, TAL und DCT (alle etwa 80 U/g Trockengewicht - (16)). Eine Stimulation der Glutaminase durch die metabolische Acidose findet aber in auffallender Parallelität zum beschriebenen Einfluß auf die FBPase nur im PCT statt und zwar bis zu Aktivitäten von 500 U/g Trockengewicht nach 7tägiger NH_4Cl-Gabe im Trinkwasser.
In etwas geringerem Ausmaß wird Ammoniak auch aus Glutamat gebildet (76). Quantitativ histochemisch zeigt die Glutamatdehydrogenase bei bevorzugter Lokalisation im subcapsulären Nephron (SCN) maximale Aktivitäten im PCT und PST (PCT_{SCN} 63 U/g Trockengewicht; PST_{SCN} 51 U/g; TAL 36 U/g; DCT 30 U/g - (88)).
Die qualitative Histochemie beschreibt eine schwache Anfärbung von PCT und CD, eine mittlere Farbintensität im PST und einen negativen Ausfall der Reaktion in Henle'scher Schleife und DCT. Das Bild ändert sich wie bei der quantitativen Histochemie der Glutaminase nur im PCT der Acidoseratte durch Steigerung der schwachen Anfärbung in eine star-

ke, die in Acidose den Intensitätsgrad des PSTs übertrifft (91). Als möglicherweise geschwindigkeitsbegrenzend für die renale Ammoniaksynthese wird auch die Verfügbarkeit des Coenzyms der Glutamatdehydrogenase NAD diskutiert (73).
Einige Autoren beschreiben den Glutamintransport durch die Mitochondrienmembran als geschwindigkeitsbegrenzend für den renalen Glutaminumsatz und führen die Stimulation der Ammoniaksynthese auf eine Adaptation des Carriers bei chronischer Acidose zurück (94).
Auch die Enzyme des erst in den letzten Jahren in seiner Bedeutung für die renale Ammoniaksynthese erkannten Purinnucleotidcyclus erfahren bei Acidose eine Stimulation (6). Das im Cyclus gebildete Fumarat ist als mögliches Substrat der Gluconeogenese dem αKetoglutarat zur Seite zu stellen (siehe Abb. 2!).
Zur Frage der hormonellen Vermittlung der Stoffwechselimpulse (siehe 36) und ihrer Realisierung durch Enzymaktivierung, -neusynthese oder verminderten Abbau bringen die Experimente dieser Arbeit keinen Aufschluß. Während Hems (37) eine Stimulation der Aktivität ohne Konzentrationsänderung für PEPCK, FBPase, G6Pase und Glutaminase in metabolischer Acidose postulierte, konnten Iynedjian & Hanson (42) eine erhöhte Konzentration oder template activity auf der Ebene der mRNA für die PEPCK in Acidose nachweisen. Durch Immuntitration zeigte Seyama (92), daß die erhöhte Glutamatdehydrogenaseaktivität bei Acidoseratten durch vermehrtes Enzymprotein bedingt ist.

FBPase/PFK-futile cycle im Rattennephron

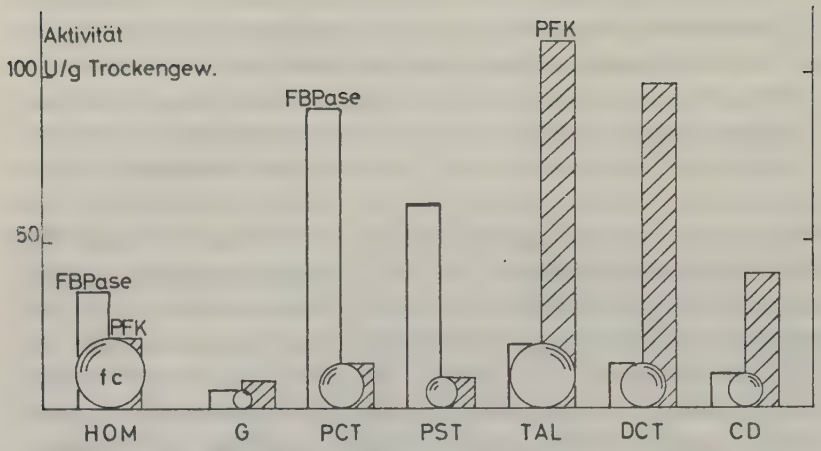
Die Messungen von FBPase und 6-Phosphofructokinase (81) im Nierenhomogenat schließen nicht aus, daß in einem renalen F6P/FBP-futile cycle mit obligater Netto-Gluconeogenese bis zu 60 % vom umgesetzten F6P unter ATP-Verbrauch rezirkulieren. (In die Kalkulationen dieses Abschnitts und Abb. 8 geht die FBPase-Gesamtaktivität ein, weil es im futile cyc-

le um die Metabolisierung der Substrate und nicht um ein spezielles Enzym geht.) Das steht im Widerspruch zu den Befunden, daß

1. ein Beitrag eines F6P/FBP-futile cycles zur Detritiierung von Glucose bei der Gesamtratte in vivo bisher unter der Nachweisgrenze aller Experimente mit doppelt markierter Glucose liegt (44) und
2. eine Netto-Glykolyse aufgrund physiologischer Daten als wichtige Energiequelle des Nierenmarks anzusehen ist (94).

Werden aber beide Enzymaktivitäten - Fructosebisphosphatase und 6-Phosphofructokinase (81) - im Rattennephron bestimmt, läßt sich für die 4 Strukturen mit hohem Enzymgehalt (PCT, PST, TAL und DCT) nur eine maximale Cyclisierung von je 15 % auf der Stufe von F6P/FBP kalkulieren. Die hohen Cyclisierungsraten im Glomerulus (60 %) und Sammelrohr (25 %) fallen aufgrund der geringen Enzymaktivitäten (nur unspezifische FBPase, die im eigentlichen Sinn nicht Gegenstand des theoretischen futile cycle-Problems ist) nicht ins Gewicht. Es kann wohl davon ausgegangen werden, daß auch in G und CD wie in TAL und DCT eine Netto-Glykolyse stattfindet, im Gegensatz zur Netto-Gluconeogenese im PCT und PST. Das unter der falschen Annahme der biochemischen Homogenität des Nierengewebes kalkulierte, offensichtlich sinnlose Ausmaß (60 %) des futile cycles F6P/FBP reduziert sich durch die quantitativ histochemische Bestimmung der beteiligten Enzyme zwanglos auf ein verständliches Maß: 15 % der jeweils vorherrschenden Aktivität im PCT, PST, TAL und DCT bzw. etwa 12 U/g Trockengewicht im Schnitt in allen 6 untersuchten Strukturen. Dies stellt zudem für sich wieder einen Maximalwert dar, der durch die beschriebenen (siehe Einleitung) regulatorischen Einflüsse weiter gemindert wird.

Der in Abb. 2 formulierte F6P/FBP-futile cycle läßt die Strukturisomerie der Moleküle außer acht. Tatsächlich erreicht die 6-Phosphofructokinase in diesem Cyclus nicht ihre maximale Aktivität, weil sie eine anomere Präferenz für



Enzymaktivitäten des FBPase/PFK-futile cycles im Rattennephron

Abb. 8: Enzymaktivitäten (U/g Trockengewicht) des FBPase/PFK-futile cycles (fc) im Rattennephron

FBPase-Gesamtaktivität (Tab. 3 und 4) und Aktivität der PFK (Schmid, H. et al., 81) im Rattennierenhomogenat und in 6 Nephroneinzelstrukturen der Ratte bei normaler Fütterung..
Die jeweils kleinere Enzymaktivität entspricht dem theoretisch maximalen futile cycle.

ß-D-Fructose-6-phosphat und nicht - wie Glucosephosphatisomerase! - für das von der Fructosebisphosphatase produzierte Anomer α-D-Fructose-6-phosphat hat (5). In der Leber scheint die Anomerisierung der Fructosephosphate geschwindigkeitslimitierend gegenüber den Umsatzraten von PFK und FBPase im futile cycle. Vorgeschlagen wurde ein Modell der Regulation von PFK und FBPase auf der Grundlage der anomeren Spezifität ihrer katalytischen und allosterischen Bindungsstellen (50). Eine Computersimulation des Modells ergab eine Reduktion der futile cycle-Rate auf 37 % des Ausgangswertes allein durch Berücksichtigung der anomeren Regulation.
Weil Aktivitätsunterschiede von 7 : 1 bzw. 1 : 7 zwischen FBPase und PFK im PCT, PST und TAL, DCT vorliegen, kann die ATP-Hydrolyse auf dieser Stufe als gering eingeschätzt werden. Gleichzeitig bestehen aber noch günstige Voraussetzungen für eine regulatorische Verstärkerfunktion dieses Cyclus (63): und zwar ergibt sich eine Regulation der Gluconeogenese durch die rezirkulierende PFK im PCT und PST einerseits, wie der Glykolyse durch die rezirkulierende FBPase im TAL und DCT andererseits.

FBPase / Tubuluslänge

Die Kalkulation der FBPase-Aktivität/Tubuluslänge dient dem Vergleich mit quantitativ histochemischen Daten der Burg-Technik und mit physiologischen Befunden.
Es ergibt sich eine unerwartete Ähnlichkeit der Aktivitätsprofile von Glutamatdehydrogenase im Kaninchennephron (40) und FBPase im Rattennephron (siehe Tab. 12), ein Bild, in das die Glutamatdehydrogenase der Ratte nicht hineinpaßt (siehe oben, 88). Die Gluconeogeneserate/Längeneinheit im Kaninchennephron (39) unterscheidet sich von der gluconeogenetischen FBPase der Ratte, indem sie im PST höhere Werte zeigt als im PCT, eine gleichermaßen in PCT und PST signifikante Stimulation im Verlauf der Fastenperiode und Ak-

tivitäten, die um 1 bis 2 Zehnerpotenzen unter denen der FBPase liegen (geschwindigkeitslimitierende PEPCK?).

Tab. 12: Enzymaktivitäten und Glucoseproduktionsraten / Längeneinheit

Struktur	FBPase	GlDH (40)	Glucoseproduktion (39)	
µU/mm	Ratte	Kaninchen	Kaninchen 24h/48h	H
PCT	N/H/A 16/17/23	15	0,2	0,5
PST	11	10	0,3	0,5
TPH	?	1,3	0,1	0,1
TAL	1,5	?	?	?
DCT,CD	<1	?	?	?

Microperfusionsexperimente ergeben für das proximale Convolut der Rattenniere eine Reabsorptionsrate für Glucose von 35 x 10^{-12} Mol x mm^{-1} x min^{-1} (4), das entspricht der doppelten FBPase-Aktivität. Weil der proximale Tubulus die Glucose des Primärharns vollständig reabsorbiert (27), steht ihm unter den Strukturen des Nephrons die meiste Glucose zur Verfügung. Warum ist er dann zusätzlich noch mit den Markerenzymen der Gluconeogenese PEPCK, FBPase und Fructosebisphosphataldolase B ausgestattet? Dies wird im Licht der folgenden Hypothese verständlich (97): Indem der proximale Tubulus unter physiologischen Bedingungen auf die Gluconeogenese festgelegt ist, wird eine durch das Überangebot von Glucose bedingte, excessive Glykolyse im PCT und PST verhindert und sichergestellt, daß der proximale Tubulus seine ganze reabsorbierte Glucose ans Blut weiterleitet. Zusätzlich synthetisiert er aber noch etwa so viel Glucose - und gibt sie ans Blut ab - wie in den distalen Strukturen verstoffwechselt wird. Das hat zur Folge, daß bei der Ratte trotz beträchtlicher Aktivitäten der Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in der Niere weder eine signifikante Nettoglucoseabgabe noch eine Glucoseaufnahme zu messen ist (11).

Die Wachsmuthsche Hypothese wird gestützt durch den experimentellen Nachweis der Zonierung des Kohlenhydratstoffwechsels im Rattennephron. Die Übernahme der Glucose in den Zellstoffwechsel wird katalysiert durch Hexokinase und eventuell Glucose-6-phosphatase. Bei einer Hexokinaseaktivität im proximalen Convolut von 2,2 µU/mm Tubulus (87) können dem Stoffwechsel der Epithelien des PCT durch dieses Enzym nur 6 % der reabsorbierten Glucose durch Phosphorylierung zugeführt werden. Billigt man mit Nordlie (65) der renalen Glucose-6-phosphatase ebenfalls eine Phosphotransferasefunktion zu, so erhöht sich der Prozentsatz der maximal phosphorylierten Glucose im proximalen Convolut auf das Doppelte. Denn die bei geringer Spezifität der Methode im PCT gemessene G6Pase-Aktivität von 15 U/g Trockengewicht (88) entspricht überschlagsmäßig 3 µU/mm Tubulus.

Zonierung des Kohlenhydratstoffwechsels

Ein Vergleich der Zonierung der Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels von Leber und Niere macht Unterschiede des regulatorischen Verhaltens beider Organe deutlich: Dem proximalen Tubulus entspricht in seiner Funktion als Kompartiment der renalen Gluconeogenese die Periportalzone der Leber (Zone 1 nach Rappaport, 74) aufgrund ihrer überwiegend gluconeogenetischen Enzymausstattung. Analog ist der distale Tubulus als Kompartiment der Glykolyse der perivenösen Zone der Leber (Zone 3 nach Rappaport) zu vergleichen. Im Gegensatz zur klaren histologischen Abgrenzung der Nephronstrukturen gegeneinander erweisen sich die Zonengrenzen des Leberacinus als dynamisch, d.h. als abhängig vom Funktionszustand. Sasse et al. (80) machten in qualitativ histochemischen Experimenten am Beispiel der hepatischen Glucose-6-phosphatase anschaulich, daß sich eine Gluconeogenesestimulation durch 24 Stunden Fasten in der Rattenleber nicht nur in einer Aktivitätssteigerung der G6Pase in den Zellen der Periportalzone manifestiert, son-

dern gleichzeitig in einer Ausweitung des relativen Anteils der G6Pase-positiven Zone von 50 % des Leberparenchyms auf 80 %. Dieser Befund wurde mit den Methoden der Quantitativen Histochemie für 3 Markerenzyme der Gluconeogenese bestätigt: Durch Fasten werden in der Rattenleber die Aktivitäten von PEPCK (33), FBPase (89) und G6Pase (47) in der gluconeogenetischen Periportalzone verdoppelt, die Aktivitäten in der glykolytischen Perizentralzone vervierfacht. Diese Angleichung der Enzymaktivitäten auf einem höheren Niveau kann als Ausdruck des Wachstums der gluconeogenetischen Zone auf Kosten der glykolytischen Zone während der Stimulation interpretiert werden. Der Nachweis einer dynamischen Zonierung kann für die hepatische FBPase nur aufgrund der hohen Sensitivität der auch in dieser Arbeit benutzten Methode erbracht werden (89), während eine Dissektion des gesamten Periportal- bzw. Pericentralfeldes die Dynamik des FBPase-Aktivitätsgradienten im Leberläppchen bei Stimulation nicht in statistisch signifikanter Form erfaßt (46).

Im Gegensatz zum Leberenzym hat sich die Zonierung der FBPase im Rattennephron in unseren Fütterungsexperimenten als statisch erwiesen. Eine signifikante Stimulation der FBPase bei Hunger und Acidose bietet nur die Struktur mit höchster basaler gluconeogenetischer Aktivität. Eine Einbeziehung "glykolytischer Nephronstrukturen" in die Glucoseproduktion findet unter den gewählten Bedingungen nicht statt.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Mit einer spezifischen Methode der Quantitativen Histochemie (Lowry-Technik: Microdissektion lyophilisierter Schnitte, Quarzfadenwaage, oil-well-Technik, Purinnucleotidverstärkersystem, Fluorimetrie) wurde die Aktivität der Fructosebisphosphatase (FBPase), eines Markerenzyms der Gluconeogenese, in folgenden Strukturen der Rattenniere gemessen: Glomerulus, pars contorta und pars recta des Hauptstücks, dicker aufsteigender Teil der Henle'schen Schleife, pars contorta des Mittelstücks und Sammelrohr.
Alle 6 Nephronabschnitte zeigen eine geringe unspezifische durch Adenosinmonophosphat nicht hemmbare FBPase-Restaktivität, aber nur für 3 Strukturen konnte eine spezifische FBPase-Aktivität (definiert als Differenz aus FBPase-Gesamt- und durch AMP nicht hemmbarer FBPase-Restaktivität) als signifikant gesichert werden: Eine hohe spezifische FBPase-Aktivität wurde in beiden Teilen des Hauptstücks - maximal in der pars contorta - eine geringe Aktivität wurde im dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife gefunden.
Eine 48stündige Fastenperiode und eine 48stündige Ammoniumchlorid-Acidosefütterung der Ratten erbrachten jeweils eine Stimulation der spezifischen FBPase-Aktivität in der pars contorta des Hauptstücks. Diese Fütterungsexperimente waren ohne Einfluß auf die spezifische FBPase der anderen Nephronabschnitte und die unspezifische FBPase.
Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der Literatur über die Lokalisation von anderen Markerenzymen der Gluconeogenese, Glykolyse und Ammoniaksynthese im Nephron diskutiert als organspezifische Lösung des futile cycle-Problems.
Die Befunde der Stimulation der renalen FBPase bei Hunger und Acidose werden in den Rahmen der Modelle zur Funktion der Nierengluconeogenese gestellt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Alleyne, G.A.O. and G.H. Scullard:
Renal metabolic response to acid base changes.
I Enzymatic control of ammoniagenesis in the rat.
J. Clin. Invest. 48, 364-370 (1969)

2. Anderson, J.W. and L. Stowring:
Glycolytic and gluconeogenic enzyme activities in renal cortex of diabetic rats.
Am. J. Physiol. 224, 930-936 (1973)

3. Bartlett, M.S.:
Some examples of statistical methods of research in agriculture and applied biology.
J. Roy. Statist. Soc. Suppl. 4, 137-170 (1937)

4. Baumann, K., Y.H. Chan, F.Bode, F. Papavassilion, and M. Wagner:
Effect of parathyroid hormone on renal tubular fluid and glucose reabsorption.
in: Angielski, S. and U.C. Dubach:
Biochemical aspects of renal function
Bern: Huber 1975 p. 223-228

5. Bloxham, D.P. and D.A. York:
Metabolic flux through phosphofructokinase and fructose 1,6-diphosphatase and its relation to lipogenesis in genetically obese rats.
Biochem. Soc. Trans. 4, 989-993 (1976)

6. Bogusky, R.T., L.M. Lowenstein, and J.M. Lowenstein:
The purine nucleotide cycle. A pathway for ammonia production in the rat kidney.
J. Clin. Invest. 58, 326-335 (1976)

7. Bonting, S.L., A.D. Tsoodle, H. deBruin, and B.R. Mayron:
Quantitative histochemistry of the nephron: VIII
Various phosphatases in the healthy human kidney.
Arch. Biochem. Biophys. 91, 130-137 (1960)

8. Burch, H.B., A.M. Kuhlman, J.Skerjance, and O.H. Lowry:
Changes in patterns of enzymes of carbohydrate metabolism in the developing rat kidney.
Pediatrics 47, 199-206 (1971)

9. Burg, M.B., J. Grantham, M. Abramow, and J. Orloff:
Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons.
Am. J. Physiol. 210, 1293-1298 (1966)

10. Chiquoine, A.D.:
The distribution of glucose 6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse.
J. Histochem. Cytochem. 1, 429-435 (1953)

11. Churchill, P.C., F.L. Belloni, and M.C. Churchill:
Net renal glucose release in the rat.
Am. J. Physiol. 225, 528-531 (1973)

12. (a) Clark, M.G., D.P. Bloxham, P.C. Holland, and H.A. Lardy:
Estimation of the fructose 1,6-diphosphatase - phosphofructokinase substrate cycle and its relationship to gluconeogenesis in rat liver in vivo.
J. Biol. Chem. 249, 279-290 (1974)

13. (b) Clark, M.G., N.M. Kneer, A.L. Bosch, and H.A. Lardy:
The fructose 1,6-diphosphatase - phosphofructokinase substrate cycle. A site of regulation of hepatic gluconeogenesis by glucagon.
J. Biol. Chem. 249, 5695-5703 (1974)

14. Clarke, F.M. and C.J. Masters:
Multi-enzyme aggregates: New evidence for an association of glycolytic components.
Biochim. Biophys. Acta 327, 223-226 (1973)

15. Cohen, J.J. and M. Barac-Nieto:
Renal metabolism of substrates in relation to renal function.
in: Handbook of physiology, Renal physiology, sect. 8, chapter 27, p. 909-1001, Baltimore: Waverly Press 1973

16. Curthoys, N.P. and O.H. Lowry:
The distribution of glutaminase isoenzymes in the various structures of the nephron in normal, acidotic and alkalotic rat kidney.
J. Biol. Chem. 248, 162-168 (1973)

17. David. H.A., H.O. Hartley, and E.S. Pearson:
The distribution of the ratio, in a single normal sample, of range to standard deviation.
Biometrika 41, 482-493 (1954)

18. Dies, F., J. Herrera, M. Matos, E. Avelar, and G. Ramos:
Substrate uptake by dog kidney in vivo. Relationship between renal substrate uptake and tubular sodium reabsorption in the dog.
Am. J. Physiol. 218, 405-416 (1970)

19. Dubach, U.C.:
Quantitative Histochemie der Niere. Untersuchungen mit Hilfe der Lowry-Methoden am Nephron.
Klin. Wschr. 41, 157-162 (1963)

20. Dunn, A., J. Katz, S. Golden, and M. Chenoweth:
Estimation of glucose turnover and recycling in rabbits using various (^{3}H, ^{14}C)glucose labels.
Am. J. Physiol. 230, 1159-1162 (1976)

21. Dunnett, C.W.:
A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control.
J. Am. Statist. Assoc. 50, 1096-1121 (1955)

22. Dzurik, R. and V. Chorvathovà:
Relation between the uptake of glucose and fatty acids by the rat kidney in vivo.
Physiol. Bohemoslav. 21, 361-365 (1972)

23. Enzyme nomenclature, recommendations (1972) of the IUPAC and IUB.
Amsterdam: Elsevier Scient. Publ. Comp. 1973
in: Florkin, M. and E.H. Stotz:
Comprehensive Biochemistry, Vol. 13

24. hierzu: Supplement 1: Corrections and additions (1975).
Biochim. Biophys. Acta 429, 1-45 (1976)

25. Flores, H. and G.A.O. Alleyne:
Phosphoenolpyruvate carboxykinase of kidney. Subcellular distribution and response to acid-base changes.
Biochem. J. 123, 35-39 (1971)

26. Froesch, E.R., J. Ashmore and A.E. Renold:
Comparison of renal and hepatic effects of fasting, cortisone administration and glucose infusion in normal and adrenalectomized rats.
Endocrinology 62, 614-620 (1958)

27. Frohnert, P.P., B. Höhmann, R. Zwiebel and K. Baumann:
Free flow micropuncture studies of glucose transport in the rat nephron.
Pflügers Arch. 315, 66-85 (1970)

28. Glabman, S., R.M. Klose and G. Giebisch:
Micropuncture study of ammonia excretion in the rat.
Am. J. Physiol. 205, 127-132 (1963)

29. Goodman, A.D., R.E. Fuisz and G.E. Cahill:
Renal gluconeogenesis in acidosis, alkalosis, and potassium deficiancy: Its possible role in regulation of renal ammonia production.
J. Clin. Invest. 45, 612-619 (1966)

30.(a) Guder, W.G.:
Regulation der Gluconeogenese der Niere.
Habil.-Schrift, München, 1973

31. Guder, W.G. and U. Schmidt:
The localization of gluconeogenesis in rat nephron. Determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase in microdissected tubules.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 273-278 (1974)

32.(a) Guder, W.G. und U. Schmidt:
Enzymatic organization of carbohydrate metabolism along the nephron. in: Giovannetti, S.:
Proc. 6th int. Congr. Nephrol., Florence 1975
Basel: Karger 1976, p. 187-195

33.(b) Guder, W.G. and U. Schmidt:
Liver cell heterogeneity. The distribution of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the liver lobule of fed and starved rats.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1793-1800 (1976)

34.(b) Guder, W.G., U. Schmidt, E.A. Siess, B. Stukowski, and O.H. Wieland:
Characterization of kidney carbohydrate metabolism by determination of phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate dehydrogenase activities.
Proc. 5th Int. Symp. on Clin. Enz. (Venezia), III, 875-889 (1973)

35. Heinz, F.:
Enzyme des Fructosestoffwechsels. Änderungen von Enzymaktivitäten in Leber und Niere der Ratte bei fructose- und glucosereicher Ernährung.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 399-404 (1968)

36. Hems, D.A.:
Biochemical aspects of renal ammonia formation in metabolic acidosis.
Enzyme 20, 359-380 (1975)

37. Hems, D.A.:
Carbohydrate metabolism in relation to kidney function.
in: Schmidt, U. and U.C. Dubach:
Renal metabolism in relation to renal function.
Bern: Huber 1976 p. 26-39

38. Hochachka, P.W. and K.B. Storey:
Metabolic consequences of diving in animals and man. The diving habit calls for controlled oscillation between aerobic and anaerobic metabolism.
Science 187, 613-621 (1975)

39. Höhmann, B. and K. Schärer:
Gluconeogenesis in isolated nephron segments of the rabbit.
in: Angielski, S. and U.C. Dubach:
Biochemical aspects of renal function.
Bern: Huber 1975 p. 47-50

40. Höhmann, B., R. Zwiebel, A. Yamagata und R. Kinne:
Enzymaktivitäten im isolierten proximalen Tubulus der Kaninchenniere.
Pflügers Arch. 312, 110-125 (1969)

41. Hue, L. and H.G. Hers:
On the use of (^{3}H,^{14}C)labelled glucose in the study of the so-called futile cycles in liver and muscle.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 532-539 (1974)

42. Iynedjian, P.B. and R.W. Hanson:
Regulation of mRNA coding for renal phosphoenolpyruvate carboxykinase.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1397 (1977)

43. Kamm, D.E. and G.L. Strope:
The effects of acidosis and alkalosis on the metabolism of glutamine and glutamate in renal cortex slices.
J. Clin. Invest. 51, 1251-1263 (1972)

44. Katz, J. and R. Rognstad:
Futile cycles in the metabolism of glucose.
Curr. Top. Cell. Regul. 10, 238-290 (1976)

45. Katz, N. and K. Jungermann:
Autoregulatory shift from fructolysis to lactate gluconeogenesis in rat hepatocyte suspensions. The problem of metabolic zonation of liver parenchyma.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 359-375 (1976)

46.(a) Katz, N., H.F. Teutsch, K. Jungermann and D. Sasse:
Heterogeneous reciprocal localization of fructose-1,6-bisphosphatase and of glucokinase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue.
FEBS-Letters 83, 272-276 (1977)

47.(b) Katz, N., H.F. Teutsch, D. Sasse and K. Jungermann:
Heterogeneous distribution of glucose-6-phosphatase in microdissected periportal and perivenous rat liver tissue.
FEBS-Letters 76, 226-230 (1977)

48. Kissane, J.M. and E. Hoff:
Quantitative histochemistry of the kidney. II Enzymatic activities in glomeruli and proximal tubules in aminonucleoside nephrosis in rats.
J. Histochem. Cytochem. 10, 259-268 (1962)

49. Kneer, N.M., A.L. Bosch, M.G. Clark and H.A. Lardy:
Glucose inhibition of epinephrine stimulation of hepatic gluconeogenesis by blockade of the α-receptor function.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4523-4527 (1974)

50. Koerner, T.A.W., R.J. Voll and E.S. Younathan:
A proposed model for the regulation of phosphofructokinase and fructose 1,6-bisphosphatase based on their reciprocal anomeric specificities.
FEBS Letters 84, 207-213 (1977)

51. Krebs. H.A., D.A.H. Bennett, P. deGasquet, T. Gascogne and T. Yoshida:
Renal gluconeogenesis: The effect of diet on the gluconeogenic capacity of rat-kidney-cortex-slices.
Biochem. J. 86, 22-27 (1963)

52. Kriz, W.:
Der architektonische und funktionelle Aufbau der Rattenniere.
Z. Zellforsch. 82, 495-535 (1967)

53. Latzko, E. und M. Gibbs:
"Alkalische" C_1-Fructose-1,6-diphosphatase.
in: Bergmeyer, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse
Weinheim: Verlag Chemie 1974 S. 914-917

54. Lojda, Z., R. Gossrau und T.H. Schiebler:
Enzym-histochemische Methoden.
Berlin: Springer 1976

55.(a) Longshaw, I.D. and C.I. Pogson:
The effects of steroids and ammonium chloride acidosis on phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat kidney cortex. I Differentiation of the inductive process and characterization of enzyme activities.
J. Clin. Invest. 51, 2277-2283 (1972)

56.(b) Longshaw, I.D., G.A.O. Alleyne and C.I. Pogson:
The effects of steroids and ammonium chloride acidosis on phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat kidney cortex. II The kinetics of enzyme induction.
J. Clin. Invest. 51, 2284-2291 (1972)

57. Lowry, O.H. and J.V. Passonneau:
A flexible system of enzymatic analysis.
New York: Academic Press 1972

58. Lowry, O.H., J.V. Passonneau, D.W. Schulz and M.K. Rock:
The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling.
J. Biol. Chem. 236, 2746-2755 (1961)

59. Masters, C.J.:
Metabolic control and microenvironment.
Curr. Top. Cell. Regul. 12, 75-105 (1977)

60. McCann, W.P.:
Intra-renal distribution of glucose-6-phosphatase: Methodological and physiological considerations.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 124, 185-187 (1967)

61. McManus, J.F.A.:
Histological and histochemical uses of periodic acid.
Stain Technol. 23, 99-108 (1948)

62. Newsholme, E.A. and W. Gevers:
Control of glycolysis and gluconeogenesis in liver and kidney cortex.
Vitam. Horm. 25, 1-87 (1967)

63. Newsholme, E.A. and C. Start:
Regulation in metabolism.
London: John Wily 1973

64. Newsholme, E.A., B. Crabtree, S.J. Higgins, S.D. Thornton and C. Start:
The activities of fructose diphosphatase in flight muscles from the bumle-bee and the role of this enzyme in heat generation.
Biochem. J. 128, 89-97 (1972)

65. Nordlie, R.C.:
Some properties and possible physiological functions of phosphotransferase activities of microsomal glucose-6-phosphatase.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 166, 699-718 (1971)

66. Owen, O.E., P. Felig, A.P. Morgan, J. Wahren and G.F. Cahill:
Liver and kidney metabolism during prolonged starvation
J. Clin. Invest. 48, 575-583 (1969)

67. Pearson, E.S. and M.A. Stephens:
The ratio of range to standard deviation in the same normal sample.
Biometrika 51, 484-487 (1964)

68. Penhoet, E.E., M. Kochman and W.J. Rutter:
Molecular and catalytic properties of aldolase C.
Biochemistry 8, 4396-4402 (1969)

69. Pogell, B.M., A. Tanaka and R.C. Siddons:
Natural activators for liver fructose 1,6-diphosphatase and the reversal of 5'AMP inhibition by muscle phosphofructokinase.
J. Biol. Chem. 243, 1356-1367 (1968)

70. Pontremoli, S. and B.L. Horecker:
Fructose 1,6-bisphosphatase.
in: Boyer, P.D.:
The enzymes.
New York: Academic Press 1973 Vol. IV, p. 611-648

71. Pontremoli, S., E. Melloni, F. Salamino, A. de Flora and B.L. Horecker:
Changes in activity and molecular properties of fructose 1,6-bisphosphatase during fasting and refeeding. Proc. Nat. Acad. Sci USA 71,1776-1779 (1974)

72. Preuss, H.G.:
Renal glutamate metabolism in acute metabolic acidosis
Nephron 6, 235-246 (1969)

73. Preuss, H.G. and R.F. Weiss:
Rate limiting factors in rat kidney slice ammoniagenesis.
Am. J. Physiol. 221, 458-464 (1971)

74. Rappaport, A.M.:
The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure.
Beitr. Path. 157, 215-243 (1976)

75. Reinecke, R.M.:
The kidney as a source of glucose in the eviscerated rat.
Am. J. Physiol. 140, 276-285 (1943)

76. Roobol,A. and G.A.O. Alleyne:
Control of renal cortex ammoniagenesis and its relationship to renal cortex gluconeogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 362, 83-91 (1974)

77. Roxe, D.M., G.E. Schreiner and H.G. Preuss:
Regulation of renal gluconeogenesis and ammoniagenesis by physiological fuels.
Am. J. Physiol. 225, 908-911 (1973)

78. Sachs, L.:
Angewandte Statistik, 4. Aufl.
Berlin/ Springer 1974

79. Sánchez-Medina, F., J.G. Garcia-Ruiz, J.A. Lupiañez, M.J. Faus and P. Hortelano:
Induction of rat kidney gluconeogenic ability after impairment of liver gluconeogenesis.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1407 (1977)

80. Sasse, D., N. Katz and K. Jungermann:
Functional heterogeneity of rat liver parenchyma and of isolated hepatocytes.
FEBS-Letters 57, 83-88 (1975)

81. Schmid, H., M. Scholz, A. Mall, U. Schmidt. W.G. Guder and U.C. Dubach:
Carbohydrate metabolism in rat kidney: Heterogeneous distribution of glycolytic and gluconeogenic key enzymes.
in: Guder, W.G. and U. Schmidt:
Biochemical nephrology
Biochemistry Vol. 8, 282-289
Bern: Huber 1978

82.(a) Schmidt. U. and U.C. Dubach:
Differential enzymatic behaviour of single proximal segments of the superficial and juxtamedullary nephron. II LDH, ICDH, MDH, GlDH, G6PDH
Z. Ges. Exp. Med. 155, 340-353 (1971)

83.(b) Schmidt, U. und U.C. Dubach:
Quantitative Histochemie am Nephron.
Stuttgart: Fischer 1971
in: Progress in Histochemistry and Cytochemistry
Vol. 2, No. 3

84.(a) Schmidt, U. and U.C. Dubach:
Acute renal failure in the folate-treated rat: Early metabolic changes in various structures of the nephron.
Kidney Int. 10, S-39 - S-45 (1976)

85.(b) Schmidt, U. and W.G. Guder:
Sites of enzyme activity along the nephron.
Kidney Int. 9, 233-242 (1976)

86. Schmidt, U. and M. Horster:
Na-K-activated ATPase: activity maturation in rabbit nephron segments dissected in vitro.
Am. J. Physiol. 233, F55 - F60 (1977)

87(a) Schmidt, U., I. Marosvari and U.C. Dubach:
Renal metabolism of glucose: Anatomical sites of hexokinase activity in the rat nephron.
FEBS-Letters 53, 26-28 (1975)

88.(b) Schmidt. U., W.G. Guder, B. Funk and U.C. Dubach:
Metabolic patterns in various structures of the rat nephron: The distribution of enzymes of carbohydrate metabolism.
in: Angielski, S. and U.C. Dubach:
Biochemical aspects of renal function.
Bern: Huber 1975, 22-32

89. Schmidt. U., H. Schmid, W.G. Guder, B. Funk, A. Mall and J. Weiss:
Liver cell heterogeneity. The distribution of fructose-bisphosphatase in fed and fasted rats and in man.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 193-198 (1978)

90. Scrutton, M.C. and M.F. Utter:
The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues.
Ann. Rev. Biochem. 37, 249-302 (1968)

91. Seyama, S., S. Iijima and N. Katunuma:
Biochemical and histochemical studies on response of ammonia-producing enzymes for NH_4Cl-induced acidosis.
J. Histochem. Cytochem. 25, 448-457 (1977)

92. Seyama, S., T. Saheki and N. Katunuma:
Comparison of properties and inducibility of glutamate dehydrogenase in rat kidney and liver.
J. Biochem. 73, 39-45 (1973)

93. Steiner, A.L., A.D. Goodman and D.H. Treble:
Effect of metabolic acidosis on renal gluconeogenesis in vivo.
Am. J. Physiol. 215, 211-217 (1968)

94. Stoff, J.S., F.H. Epstein, R. Narins and A.S. Relman:
Recent advances in renal tubular biochemistry.
Ann. Rev. Physiol. 38, 46-68 (1976)

95. Taketa, K. and B.M. Pogell:
Allosteric inhibition of rat liver fructose-1,6-diphosphatase by adenosine-5'-monophosphate.
J. Biol. Chem. 240, 651-662 (1965)

96. Uyeda, K. and J.L. Lyune:
Studies on the effect of fructose-diphosphatase on phosphofructokinase.
J. Biol. Chem. 249, 4562-4570 (1974)

97. Wachsmuth, E.D., M. Thörner and G. Pfleiderer:
The cellular distribution of aldolase isozymes in rat kidney and brain determined in tissue sections by the immuno-histochemical method.
Histochemistry 45, 143-161 (1975)

98. Weber, G.:
Study on the evaluation of regulation of enzyme activity and synthesis in mammalian liver.
Advances Enzyme Regulation 1, 1-35 (1963)

99. Zar, J.H.:
Biostatistical analysis.
Englewood Cliffs, New York: Prentice Hall 1974

100. Zorzoli, A. and J.B. Li:
Gluconeogenesis in mouse kidney cortex. Effect of age and fasting on glucose production and enzyme activities.
J. Geront. 22, 151-157 (1967)

N A C H W O R T

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Udo Schmidt für die Überlassung des Themas und die angenehmen Arbeitsbedingungen, bei Herrn Prof. Dr. Klaus Dietz für die Unterstützung in der Auswertung der Experimente und bei Frau Dr. Heide Schmid und Frau Adelheid Mall für das glänzende Teamwork bei der Durchführung der Versuche.

Lebenslauf

Am 5.1.1951 wurde ich, Michael Konrad Scholz, als Sohn des Oberkellners Kurt Erich Ewald Scholz und seiner Ehefrau Käthe, geborene Lutz, in Düsseldorf geboren. Von 1957 bis 1961 besuchte ich in Düsseldorf die Volksschule und anschließend das Humboldt-Gymnasium, an dem ich 1969 die Reifeprüfung ablegte.
Den Wehrdienst absolvierte ich von 1969 bis 1971. Im Wintersemester 1971/72 begann ich in Tübingen das Studium der Biochemie, das ich nach Bestehen der Vordiplomsprüfung (5.10.1972 und 2.4.1975) abbrach. Im Fach Medizin war ich seit dem Sommersemester 1972 immatrikuliert und legte folgende Prüfungen ab: Naturwissenschaftliche Vorprüfung 19. 3. 1973, Ärztliche Vorprüfung 14. 9. 1974, 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 21. 4. 1976, 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 15. 9. 1977 und 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 16. 10. 1978. Die Experimente zur vorliegenden Dissertation führte ich im Frühjahr 1977 durch.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (07472) 22145